

Aus der
Medizinischen Klinik 5 – Hämatologie und Internistische Onkologie
Universitätsklinikum Erlangen
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Mackensen

**Anti-Tumor-Effekte von murinen Zytokin-stimulierten
Natürlichen-Killer-Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Max Bittrich
aus
Erfurt



Als Dissertation genehmigt von der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

Vorsitzender des Promotionsorgans:	Prof. Dr. Dr. h.c. J. Schüttler
Gutachter:	Prof. Dr. med. A. Mackensen
Gutachter:	Prof. Dr. U. Gaipf
Tag der mündlichen Prüfung:	28. Februar 2017

Der Bittrichschen Ägide gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Summary	3
3	Einleitung	5
3.1	Natürliche Killer-Zellen und das Immunsystem	5
3.2	Immunmodulierende Zytokine	16
3.3	Graft-versus-Lymphom Effekt (GvL) und Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD).....	18
3.4	Fragestellungen der vorliegenden Arbeit.....	18
4	Material und Methoden.....	21
4.1	Material.....	21
4.1.1	Reagenzien.....	21
4.1.2	Farbstoffe.....	22
4.1.3	Antikörper	22
4.1.4	Tumorzelllinien.....	22
4.1.5	Mausbestand und Benutzung	23
4.1.6	Verbrauchsmaterial.....	24
4.1.7	Geräte und Software.....	24
4.2	Methoden.....	25
4.2.1	Zellkultur	25
4.2.2	Einzelzellaufreinigung.....	26
4.2.3	Bestimmungen der Zellzahl	26
4.2.4	Magnetic cell separation (MACS)	27
4.2.5	Zytokin-Stimulation	27
4.2.6	Durchflusszytometrie	28
4.2.7	Apoptose in der Durchflusszytometrie.....	28
4.2.8	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	29
4.2.9	Zellzytotoxischer Assay	29
4.2.10	Zellzytotoxischer Assay im FACS.....	30
4.2.11	<i>In vivo</i> Biolumineszenz Bildgebung, BLI.....	30
4.2.12	<i>In vivo</i> Graft-versus-Lymphom und Graft-versus-Host Experimente ..	36
4.2.13	Statistische Analyse.....	39
5	Ergebnisse.....	40
5.1	NK-Zellen in der Durchflusszytometrie nach MACS® Aufreinigung ...	40
5.2	Morphologie der NK-Zellen und Subpopulationen nach <i>in vitro</i> Zytokin-Stimulation	42

5.3	NK-Zell-Funktion anhand IFN- γ	44
5.4	NK-Zell-Funktion anhand ihrer Zytotoxizität	45
5.4.1	Veränderung der <i>in vitro</i> Lysekapazität von NK-Zellen nach Zytokin-Stimulation	47
5.4.2	Veränderung der <i>in vitro</i> Lysekapazität von NK-Zellen nach <i>in vivo</i> Zytokin-Stimulation	48
5.5	Etablierung der Methode der Biolumineszenz Bildgebung	49
5.6	Verwendungsmöglichkeit der BCL-1-Luc ⁺ gfp ⁺ -Zellen.....	51
5.7	Graft-versus-Lymphom Effekt und Graft-versus-Host Erkrankung.....	60
6	Diskussion	66
7	Publikation	86
8	Literaturverzeichnis.....	86
9	Abkürzungsverzeichnis.....	104
10	Danksagung.....	107
11	Lebenslauf	108

1 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele

Bei Tumorerkrankungen können durch die Transplantation von Stammzellen heute neue Therapiefortschritte erzielt werden. Für den Therapieerfolg der allogenen Knochenmarktransplantation (KMT) bei hämatologischen Neoplasien sind neben der hochdosierten Radio- und Chemotherapie auch Donorimmunzellen verantwortlich.

Natürliche Killer (NK)-Zellen sind hierbei wichtige Effektorzellen der angeborenen Immunität gegen infizierte oder maligne Zellen. Die im Rahmen einer Stammzelltransplantation auftretenden schwerwiegendsten Komplikationen sind die Entwicklung von Graft-versus-Host Erkrankungen (GvHD) des Empfängers.

Neue Erkenntnisse deuten auf eine protektive Wirkung von NK-Zellen bei der Entwicklung der akuten GvHD hin. NK-Zellen vermögen das adaptive Immunsystem zu regulieren. Sie scheinen die reaktiven T-Zellen, welche gegenwärtig als Auslöser der GvHD angesehen werden, möglicherweise indirekt herunter zu regulieren. Daher sind NK-Zellen eine vielversprechende Zellpopulation für einen adoptiven Transfer bei der Therapie von Patienten mit GvHD.

Die biologischen Grundlagen beim Einsatz von Zytokin-stimulierten NK-Zellen in der Immuntherapie sind aktuell noch wenig bekannt. Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Verwendbarkeit von Zytokin-stimulierten NK-Zellen in der Immuntherapie mit dem Ziel, präklinische Grundlagen für den Einsatz in der onkologischen Zelltherapie zu erarbeiten.

Methoden

Im ersten Teil wurde die Zellkultur und Zytokin-Stimulation bearbeitet. Dabei wurden MACS separierte C57Bl/6 Milz-NK-Zellen in Zellkultur genommen und mit Zytokinen stimuliert. Anschließend wurden die Veränderungen im Phänotyp und in den Effektorzellfunktionen mit Durchflusszytometrie, ELISA und Zellzytotoxischem Assay evaluiert.

Im zweiten Teil wurde eine Methode der *in vivo* Biolumineszenz-Bildgebung (Bioluminescence Imaging, BLI) der Maus inklusive eines selbst

programmierten Auswertungsmoduls etabliert, was innerhalb der Arbeitsgruppe zuvor noch nicht durchgeführt worden war.

Zusammenführend konnten im dritten Teil die Zytokin-Stimulation und das BLI in einem neuen Graft-versus-Lymphom (GvL-) und GvHD-Tiermodell kombiniert werden. Lymphom-tragende Balb/c Mäuse erhielten eine allogene Knochenmarktransplantation und parallel eine Immunzelltherapie. Das Ausmaß der GvHD wurde anhand eines etablierten Scores ermittelt.

Ergebnisse und Beobachtungen

Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-15 (IL-15) zeigen in der *in vitro* Anwendung auf NK-Zellen vergleichbare Ergebnisse. Mit IL-2 ist die Viabilität von NK-Zellen nach Stimulation signifikant erhöht. Dabei zeigen die murinen Subpopulationen einen Shift zu CD11b exprimierenden NK-Zellen. Die Zytotoxizität scheint nach IL-2 Stimulation erhöht. Anhand der Biolumineszenz konnte der GvL-Effekt nach allogener Knochenmarkstammzelltransplantation inklusive NK-Zell-/T-Zell-Transfer nicht-invasiv beobachtet werden. Es zeigte sich eine signifikante Tumorreduktion nach Knochenmarktransplantation und T-Zell-Transfer. Auf Grund der T-Zellen war die GvHD jedoch gesteigert.

Praktische Schlussfolgerungen

Die vorliegenden Ergebnisse tragen zum grundlegenden Verständnis der biologischen Prozesse von NK-Zellen im Kontext der GvL- und GvH-Reaktion bei. Ein möglicher adoptiver Einsatz von NK-Zellen in der Immuntherapie ist vielversprechend. Zukünftig sind weitere Versuche mit besser überlebenden IL-15-stimulierten NK-Zellen gerechtfertigt, um sichere Aussagen über Effektorzellfunktionen und die Auswirkungen derer auf die GvL und GvHD treffen zu können. Somit ließen sich weitere Erkenntnisse über den Nutzen einer NK-Zell-Therapie gewinnen.

2 Summary

Background

New approaches in haematopoietic therapy increasingly show a better outcome to allogeneic stem cell transplantation. For that Graft-versus-Host disease (GvHD) is the limiting factor. Natural Killer (NK) cells are main effector cells in innate immunity against viruses and malignant cells. New data show a possible reduction of GvHD mediated by NK cells. Possibly they could suppress T cells. Meanwhile they could also maintain the desired Graft-versus-Lymphoma (GvL) effect. Thus, they are a valuable option for adoptive cell therapy. There are still many unknown mechanisms regarding the role of cytokine stimulated NK cells in GvL and GvHD. This thesis is focused on the preclinical analysis and development of adoptive NK cell immunotherapy in a setting of allogeneic stem cell transplantation.

Methods

First, cell culture and cytokine stimulation were tested. MACS separated spleen NK cells from C57Bl/6 mice were stimulated with IL-2 or IL-15. Changes in phenotype and function were measured via FACS, ELISA and cellcytotoxic assay.

Next, a new *in vivo* bioluminescence imaging method together with quantification and interpretation was established. An own software module (macro) for analysis of the results was created.

In the third part, the results were converted into a new established GvL/ GvHD animal model. BCL-1-Luc⁺gfp⁺ bearing mice were sublethal irradiated and allogen transplanted. An adoptive T cell transfer was administered in some animals.

Results

IL-2 and IL-15 showed comparable results *in vitro*. After IL-2 stimulation viability of NK cells was significantly higher. Murine NK cell subpopulations shifted more to CD11b⁺ cells. IL-2 stimulation led to higher cytotoxicity. The GvL effect was impressingly observed via bioluminescence imaging. T cells are the main effector cells of GvL after hematopoietic stem cell transplantation, but can cause GvHD.

Summary and future prospects

These results lead to a better understanding of the basic biological processes in the immunotherapy with NK cells in a setting of allogeneic stem cell transplantation. The clinical use is promising. In future experiments the use of IL-15 in the immunotherapy could be addressed. Effector cell function and cytotoxicity could be observed further. Thus, a better understanding of NK cells in GvL and GvHD biology can lead to better prospects in clinical use.

3 Einleitung

3.1 Natürliche Killer-Zellen und das Immunsystem

Frank Macfarlane Burnet postulierte Mitte des vergangenen Jahrhunderts folgende Hypothese: Säugetiere ab einer bestimmten Größe müssen evolutionär zwingend eine Erkennung von maligne entarteten somatischen Zellen (beispielsweise aufgrund genetischer Mutation) entwickelt haben [21]. Er prägte als Erster den Begriff der immunosurveillance, der Immunüberwachung. Die Fähigkeit, entartete Zellen (ohne vorherige Stimulation) zu erkennen und gegebenenfalls zu eliminieren, wirkt evolutionär begünstigend. Jahrzehnte später konnten durch intensive Forschung die Akteure dieser Überwachung bestimmt werden. Die Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) sind ein wichtiger Bestandteil dieses Systems.

Um eine Ausbreitung eingedrungener pathogener Erreger effektiv zu verhindern, bildete sich im Laufe der Evolution bei höher entwickelten Lebewesen das Immunsystem. Es gilt als eine funktionelle Einheit aus zwei unterschiedlichen Formen der Immunreaktion. Der erste Teil des Systems, als angeboren oder unspezifisch bezeichnet, steht für eine sofortige Abwehrreaktion. So kann die Zeit bis zum Einsetzen des zweiten Teils, der spezifischen adaptiven Immunantwort, überbrückt werden.

Die entwicklungsgeschichtlich früh entstandene angeborene Abwehr umfasst multiple Komponenten. Dazu zählen die physiologischen Barrieren, wie Epithelien und Endothelien, humorale Komponenten und zelluläre Bestandteile. Zirkulierende Zellen für eine direkte Interaktion sind die großen mononukleären Zellen (Monozyten), Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen. Für indirekte Wirkungen stehen die humoralen Komponenten, wie flottierende Peptide, Proteine und das vielseitige Komplementsystem zur Verfügung. Das angeborene System ist in vielen Organismen, wie in Würmern, Insekten und Fischen präsent.

Das phylogenetisch später entwickelte adaptive, spezifische Abwehrsystem basiert auf den angeborenen Mechanismen. Es besteht aus zellulären Elementen in Form von T- und B-Lymphozyten und humoralen Elementen, die zum Teil aus diesen hervorgehen. Diese löslichen Komponenten sind

Antikörper, Zytokine und Chemokine. Dieser adaptive Teil wurde bisher nur in höher entwickelten Wirbeltieren gefunden [23, 58, 86, 150].

NK-Zellen sind Bestandteil der ersten Angriffslinie der angeborenen Abwehr. Sie spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem, um bei bakteriellen und viralen Infektionen sowie Neoplasien frühzeitig und schützend zu reagieren.

Vorkommen und Entwicklung der NK-Zellen

In den 1970 Jahren wurden von Kiessling *et al.* erstmals „große granuläre Lymphozyten“ beschrieben. Eva Klein prägte 1975 den Ausdruck "Natürlicher Killer" auf Grund der Beobachtung, dass diese Lymphozyten (Subpopulation) spontan Tumorzellen lysieren konnten [89, 90]. In den achtziger Jahren wurde der Name „Natürliche Killer-Zellen“ geprägt und diese Zellen als eigenständige Leukozytenpopulation anerkannt [99, 167]. Die Entwicklung der NK-Zellen erfolgt, wie auch die der Lymphozyten, aus der CD34-tragenden hämatopoetischen Vorläuferzelle (Stammzelle). Die Reifung erfolgt im Knochenmark mittels diverser Zytokine, unter anderem IL-2, IL-15 und IL-21 [19].

Aus ihrer Funktion resultierend findet man NK-Zellen weit verteilt in vielen lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben, sowie im Blutstrom. Nach ihrer Differenzierung kommen die NK-Zellen hauptsächlich im peripheren Blut vor. Dabei sind sie mit circa 10-15% der im peripheren humanen Blut vorkommenden mononukleären Zellen die drittgrößte Lymphozyten-Population [125]. Dort überleben sie circa zwei Wochen [169], was sie ebenso im Mausmodell tun [82, 163]. Weitere Vorkommen befinden sich im Knochenmark und in den lymphatischen Organen, wie der Milz, den Lymphknoten, den Tonsillen, dem intestinalen intraepithelialen lymphatischen Kompartiment [151], dem (juvenilen) Thymus [135], sowie in sehr geringem Anteil in der Lunge und in der Leber. Durch Migration innerhalb des Lymphsystems sind sie in der Lage, in den frühen Phasen einer Infektion oder Inflammation wirksam zu werden [30, 152, 153]. Dies zeigt sich besonders bei viralen Infektionen mit Herpes-Simplex-Virus (HSV), Epstein-Barr-Virus (EBV), humanem Papillomavirus (HPV) oder mit humanem Zytomegalievirus (HCMV) [14]. Bei einer akuten Virusinfektion

zeigt sich bereits nach 3 Tagen eine messbare Aktivierung und Zunahme der Effektorzellfunktion [12, 26].

Definition der NK-Zellen

NK-Zellen gehören zur Lymphozyten-Zelllinie, da sie CD2, einen Rezeptor für das Adhäsionsmolekül von Lymphozyten Antigen 3 (LFA-3), auf ihrer Oberfläche tragen. Dabei sind sie weder den B- noch den T-Lymphozyten zuzurechnen. Wie alle Leukozyten tragen sie CD45, bei NK-Zellen genauer CD45R, auf ihrer Oberfläche (synonym B220). Die Abgrenzung zu T-Zellen war lange Zeit umstritten. Mittlerweile kann über CD3 (TCR), der T-Zell-Rezeptor, eine klare Abgrenzung gegenüber T-Zellen und NKT-Zellen vorgenommen werden. NK-Zellen besitzen diesen Rezeptor nicht. Ein weiterer klarer Unterschied zu T-Zellen ist das Fehlen einer Thymuspassage in der Reifung. NK-Zellen sind in Mäusen ohne Thymus in ihrer Funktion nur gering eingeschränkt. Bei Severe combined immunodeficient (SCID) Mäusen und RAG-1 Mäusen, wo die genetische Rekombination gestört ist und so keine reifen B- oder T-Zellen vorkommen, fungieren NK-Zellen nur gering beeinträchtigt [71, 167]. (Humane) NK-Zellen tragen einen Subbestandteil des T-Zell-Rezeptors in ihrem CD16-Rezeptor. Die insgesamt vielseitigen Cluster of Differentiation Marker (CD-Marker), die Oberflächenmarker der NK-Zellen, sind sowohl beim Mensch als auch in der Maus noch weiter zu bestimmen. Typische morphologische NK-Zell-Marker beim Menschen sind CD56, CD16 und CD335 (Synonym NKp46). Bei der Maus ist es ebenfalls NKp46, sowie NK1.1 in schwarzen C57BL/6 Mäusen, und CD49b (Synonym DX5) in weißen Balb/c Mäusen. DX5 erkennt $\alpha 2$ -Integrin, welches auf vielen Leukozyten vorkommt. Murine Balb/c NK-Zellen sind über DX5 sehr gut zu identifizieren, speziell in Verbindung mit CD11 oder NKG2D [43, 163].

Der NK-Zell-Diskriminator im Mensch ist CD56, das neural cell adhesion molecule (NCAM), in Kombination mit dem Ausschluss des T-Zell-Rezeptor-Moleküls CD3. CD56 wird außerdem auf NKT-Zellen, auf Zellen des neuronalen Gewebes und in einigen Tumoren exprimiert. Dabei definiert die Ausprägung der Expression von CD56 gemeinsam mit CD16 die NK-Zell-Subpopulationen im Menschen [36].

Weitere Rezeptoren auf NK-Zellen sind CD122, die β -Kette des IL-2 Rezeptors, sowie CD16, welches die Fc-Bindungsstelle von Immunglobulin-G Antikörpern ist. CD16 ist ein wesentlicher Faktor für die Antikörpervermittelte Toxizität (ADCC), einen Zytotoxizitätsmechanismus von NK-Zellen. Der NKG2/CD94 Komplex befindet sich ebenfalls auf der Oberfläche humaner sowie muriner NK-Zellen. Er erkennt im Zusammenspiel als Heterodimer beim Menschen MHC Klasse I (HLA-E) und in der Maus Qa-1b auf den Zielzellen [111]. Ein Teil der NK-Zellen trägt ebenfalls CD8 auf der Zelloberfläche. Dieser CD8 Rezeptor unterscheidet sich im Aufbau zu dem CD8 Rezeptor von zytotoxischen T-Zellen [11]. Zur Verdeutlichung der vielfältigen Oberflächenmoleküle sind in die typischen Marker für humane und murine NK-Zellen aufgetragen.

	Mensch	Maus
typische tragende Merkmale	CD16 CD56 NKp46	NK1.1 (C57BL/6 Stamm) NKp46 (CD335) DX5 (CD49b)
typische <u>nicht</u> -tragende Merkmale	CD3 CD4 CD19	CD3 CD4 CD19

Tabelle 1: Oberflächenmarker der NK-Zellen beim Menschen und der Maus. Modifiziert nach Vivier et al. [159].

NK-Zell-Rezeptoren

Über die Jahrtausende der Evolution haben sich bei NK-Zellen als Akut-Effektorzellen eher diejenigen Rezeptoren durchgesetzt, welche sich in der gesamten Population gegenüber der Mehrzahl an Erregern bewährt haben. Die individuelle Varianz ist im Vergleich zu den T-Lymphozyten gering. In der Superfamilie der zu den Muster-erkennenden-Rezeptoren (pattern recognition receptors, PRR) gehörigen Toll-like Rezeptoren (TLR) wurden TLR 2, 3, 4, 5, 7, 8 auf NK-Zellen gefunden [75, 101]. Diese erkennen ihre Liganden direkt und führen über eine Bildung von Interferonen (IFN), insbesondere IFN- γ , zur antiviralen Antwort. Auch maligne entartete, beschädigte oder zellulärem Stress ausgesetzte Zellen können so erkannt und eliminiert werden [136].

NK-Zellen tragen keine rekombinanten Antigen-spezifischen Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche. Sie sind daher nicht in der Lage, so spezifisch ihre Gegner angreifen zu können, wie beispielsweise die CD8⁺ T-Killer-Zellen. Trotzdem erreichen sie eine teilweise beachtliche Zytolysekapazität und

tragen einige Eigenschaften, welche sie einzigartig machen und gegen andere Immunzellen abheben [87]. Sie können als sogenannte Effektorzellen andere Zielzellen, wie Tumorzellen oder infizierte Zellen, ohne vorherige Stimulation, Aktivierung oder Priming erkennen und teilweise eliminieren. Dieser Prozess findet unabhängig vom Major Histocompatibility Complex (MHC), dem Haupthistokompatibilitäts-Komplex auf der Oberfläche aller Körperzellen statt [139, 144]. Das verleiht den NK-Zellen die Fähigkeit auch mit infizierten oder Tumorzellen umzugehen, welche oft die MHC(I)-Expression herunter regulieren, verändern oder durch eigene Proteinstrukturen blockieren oder stören. Die Tumorzelle senkt so ihre Erkennungswahrscheinlichkeit gegenüber T-Zellen [24, 145]. Um bei ihrer Funktion keine Überreaktion gegen körpereigene Zellen oder Strukturen zu verursachen, werden diese komplexen Prozesse mittels Rezeptoren auf der Oberfläche gesteuert und in Balance gehalten. Der Zell-Zell-Kontakt wird über aktivierende und inhibierende Rezeptoren gesteuert. Dabei sind die möglichen Interaktionen mannigfaltig und simultan gesteuert. Die dabei ausgelösten Signaltransduktionskaskaden sind bisher nur bruchstückhaft bekannt.

Aktivierende Rezeptoren steuern die Effektorzellfunktionen, wie die Zytotoxizität. Sie erkennen eine Veränderung von Glykoproteinstrukturen auf der Lipiddoppellayermembran der Zielzelle. Allgemein aktivierende Rezeptoren sind 2B4 (CD244) und LFA-1 (CD11a/CD18). Sie können zum Teil auch andere Populationen aktivieren. Beim Mensch sind spezifisch auf NK-Zellen vorkommende aktivierende Rezeptoren NKp46 (CD335), NKp44(CD336), welche an virale Hämagglutinine binden und NKp30 (CD337) welches an einen Subtyp von HLA-B bindet [54]. Sie alle gehören zur Superfamilie der Immunglobuline und werden zur Gruppe der natural cytotoxicity receptors zusammengefasst. Ein weiterer Rezeptor, der lectin-like Rezeptor NKG2D wirkt auf NK-Zellen ebenfalls aktivierend. Er ist im Menschen und der Maus vorhanden und verwandt mit der NKG2-Familie, bindet aber nicht an CD94. CD94 ist der killer cell lectin-like Rezeptor der Subfamilie D und auf der Oberfläche von NK-Zellen exprimiert. Das auf NK-Zellen vorkommende NKG2D bindet an humanes MIC-A und MIC-B, welche

bei zellulärem Stress und häufig bei Tumoren hochreguliert sind. In der Maus sind Rae-1 und H-60 die Liganden für NKG2D. Sie stimulieren die Zytotoxizität und die Interferon- γ (IFN- γ) Produktion [43]. Allen gemeinsam ist die letztliche Steigerung des intrazellulären Calcium-Spiegels und der anschließenden Freisetzung der zytolytisch wirksamen Vesikel und Granula der NK-Zellen. Weitere Marker für eine Aktivierung sind CD107a, CD69 und CD11c [2, 102].

Inhibitorische Rezeptoren der NK-Zellen hemmen bei der Bindung mit dem MHC-I Komplex der Zielzelle die NK-Zell-Aktivität. Im murinen Modell sind dies beispielhaft die Rezeptoren der Ly49 Klasse. Diese sind entfernt verwandt mit CD94, sie gehören allerdings einer anderen Subfamilie A an. Ein Vertreter der Ly49 Gruppe ist Ly-49D [106]. Er bindet an MHC-I oder MHC-I-ähnliche virale Bestandteile und steuert darüber die Effektorzellfunktionen. Ly49 Rezeptoren wurden bisher beim Menschen nicht gefunden.

Die inhibitorischen Rezeptoren der NK-Zellen im humanen Modell sind killer cell immunoglobulin-like Rezeptoren (KIR). Sie erkennen ebenfalls MHC-I, synonym HLA, Moleküle auf der Oberfläche der Zielzellen. Die Funktion auf NK-Zellen ist ähnlich und vergleichbar mit den Rezeptoren der Ly49 Klasse. Die Inhibition dient hauptsächlich dem Schutz von körpereigenen Zellen, dieser Prozess ist MHC-I abhängig und wird auch als licensing bezeichnet [81]. KIRs geben ihr Signal anhand von cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs) weiter. Einige KIRs können auch aktivierend wirken [157]. Dies zeigt die vielfältigen Aktionen der Rezeptoren auf, die stets simultan ablaufen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich vorrangig mit der NK-Zell-Aktivierung durch immunmodulierende Zytokine sowie der Beteiligung von NK-Zellen bei malignen Prozessen im Maus-Modell. Der Bezug zum menschlichen Organismus wird daher nur an ausgewählten Stellen hergestellt.

Subpopulationen

Weiterhin können die NK-Zellen von Mensch und Maus in Subpopulationen mit verschiedenen Aufgaben eingeteilt werden. Die bestimmenden Rezeptoren in der Maus sind CD27 und CD11b [78, 160]. Beim Menschen werden die Subpopulationen anhand von CD56 und CD16 unterteilt [36]. Zellen mit geringerer CD56 Expression, sogenannte CD56^{dim}CD16^{high}-Zellen, besitzen zusätzlich CD16 auf ihrer Oberfläche, tragen Perforin und machen 90% der humanen NK-Zellen im peripheren Blut aus. Sie weisen eine hohe Zytotoxizität auf und produzieren IFN- γ [4]. CD56 hoch exprimierende Zellen (CD56^{bright}CD16^{low}) besitzen fast kein CD16 auf ihrer Oberfläche, tragen kein Perforin und stellen die restlichen 10% der humanen NK-Zell-Population. Sie weisen eine hohe Zytokin-Produktion auf und nehmen eine immunmodulierende Rolle wahr. Die Subpopulationen unterscheiden sich bei Mensch und Maus in ihrer Gewebeverteilung entscheidend [78]. Ein direkter Vergleich zwischen Mensch und Maus scheint schwierig, humane CD56^{bright}CD16^{low}-Zellen können mit CD27 tragenden murinen NK-Zellen verglichen werden [159]. Die murinen Subpopulationen scheinen gleichzeitig die 4 Entwicklungsstufen in der NK-Zell-Reifung zu sein [29]. Ein weiterer Bestandteil zur Differenzierung der Subpopulationen ist der Tyrosinkinase Rezeptor c-kit (CD117). Er nimmt eine wichtige Funktion in der Reifung, Expansion und dem Überleben von NK-Zellen ein. Nur ein sehr geringer Teil der NK-Zellen trägt c-kit. Diesem Teil werden immunregulatorische Eigenschaften zugeschrieben [31].

Funktion

Zunächst wurde eine direkte NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber Leukämie-assoziierten-Antigenen bei eineiigen Zwillingen beobachtet [44]. Anschließend konnte eine Zunahme der Zytotoxizität bei Typ-I-Interferon-stimulierten NK-Zellen (nach einer viralen Infektion) beobachtet werden [167].

Die Zellen des angeborenen Systems reagieren allgemein schnell und unspezifisch auf Stress oder auf allgemeine mikrobielle Strukturen, wie auf Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Es folgt ein Inflamationsreiz und die Schädigung von Gewebe, was zum Eindringen

von pathogenen Erregern beitragen kann. Die schützenden Zellen des myeloischen Systems und der NK-Zellen sind aufgrund ihrer Zirkulation meist direkt am Ort des Geschehens präsent und können somit frühzeitig reagieren. Bisher wird angenommen, dass bei Ablauf dieses Entzündungs-Prozesses die Zellen nach kurzer Zeit (1 bis 2 Wochen) ihre Funktion einstellen oder wieder abwandern. Währenddessen werden die lymphatischen Zellen des adaptiven Systems aktiv. Wenn die adaptive Immunität vorab noch keinen Kontakt zum Antigen oder Pathogen gehabt hat, reagiert sie deutlich verzögert. Es bedarf einiger Zeit für die Antigen-Erkennung, Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation. Nach der klonalen Expansion, Proliferation und Migration vermitteln die Zellen des adaptiven Systems anschließend eine hoch spezifische Antwort. Danach bleiben die Zellen im Lymphsystem und außerhalb dessen für Monate bis Jahre bestehen.

NK-Zellen können antivirale, zum Teil direkt zytotoxische und tumorzellhemmende humorale Faktoren freisetzen [128]. Hauptsächlich bilden sie nach Inkubation mit ihren Zielzellen IFN- γ [44, 155]. Dies verstärkt sich besonders im Milieu der Inflammation. Hohe Konzentrationen von IL-12, IL-18, sowie Typ I Interferonen steuern eine Ausschüttung von Effektor Zytokinen, in besonderem Maße von IFN- γ [38, 119]. Außerdem steuern NK-Zellen so zum Teil selbst ihre eigene Aktivierung [154]. Laut neueren Erkenntnissen scheint neben IFN- γ auch eine autokrine Stimulation mittels IFN- β eine Rolle zu spielen [47].

Die wesentliche Funktion der NK-Zellen als Effektorzellen des Immunsystems ist die Erkennung ihrer Zielstrukturen in Form von infizierten Zellen und Krebszellen. Später entdeckt wurden weitere wichtige Funktionen, wie die Bildung immunmodulierender Zytokine und Chemokine, beispielsweise Interferon- γ (IFN- γ), Tumornekrosefaktor (TNF), Granulozyten und Makrophagen stimulierender Faktoren (GM-CSF), β -Chemokine, Makrophagen-inflammations-Protein (MIP-1 α), IL-5, IL-13 oder des auf Aktivierung hochregulierenden, physiologisch auf T-Lymphozyten exprimierten Markers (RANTES), sowie von Perforin und Granzym, welche eine entscheidende Rolle in der Zytotoxizität einnehmen [9, 17, 25, 84, 142]. Auch an der mütterlichen Toleranzentwicklung gegenüber dem Fetus

(maternofetale Toleranz) wirken NK-Zellen entscheidend mit [79, 118]. All diese Mechanismen verdeutlichen die wichtige Rolle, die NK-Zellen bei der Bildung von Brücken zwischen angeborener und erworbener Abwehr spielen. Dies wird besonders in späten Phasen einer HIV Infektion deutlich, wo die NK-Zell-Defizienz die klinische Symptomatik maßgeblich mitbestimmt [15, 38].

Zielerkennung, Spezifität und Zytotoxizität

Klas Kärre formulierte um 1984 die bis heute nicht widerlegte missing-self Hypothese. NK-Zellen werden demnach aktiv, wenn sie nicht die erwarteten Eigenschaften an Zielen vorfinden. Dies können fremde oder auch nicht ausreichend vorhandene eigene Oberflächenmoleküle sein. Er formulierte damit die ersten Regeln, nach welchen die NK-Zellen arbeiten [85, 103]. NK-Zellen sind demnach in der Lage, eine erniedrigte Expression von MHC-I Molekülen auf einer Zell Oberfläche zu erkennen. Über inhibierende Rezeptorbindung wird die NK-Zelle zeitgleich inaktiviert. Aus unserer heutigen Sicht ist die Hypothese allerdings unvollständig, da sehr stark aktivierende Bindungen und Signale diese Inhibition überschreiben können und es doch zur Aktivierung kommt. Trotzdem wird eher das Fehlen eines erwarteten Moleküls als ein wesentlicher Bestandteil der Zielerkennung von NK-Zellen gesehen.

Die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren arbeiten bei einer Zellinteraktion simultan. Der Prozess der Zielerkennung wird über viele Rezeptoren hinweg zu einem komplexen Gesamtbild zusammengebaut und stets in Balance gehalten. MHC-I Moleküle sind dabei ein wesentlicher Bestandteil. Diese Rezeptoren sind früh in der Evolutionsgeschichte entstanden. Viele Organismen oder Zellen tragen sie auf ihrer Oberfläche.

Wenn eine NK-Zelle ein passendes Antigen, einen Liganden oder das fehlende Molekül auf einer Zielzelle erkennt, vermittelt sie über Degranulation ihre Zytotoxizität. Dabei darf gleichzeitig kein inhibierendes Signal vorliegen. Zum großen Teil geschieht dies über eine direkte Ausschüttung von Perforin und Granzym und anschließende Sekretion von IFN- γ (und IFN- β). Die Ausschüttung geschieht primär über granuläre Exozytose. Zuerst erzeugt das ausgeschleuste Perforinmolekül eine Unterbrechung der Lipidmembran

der Zielzelle, eine „Pore“. Die Eintrittspforte für das Enzym Granzym-B Serin Esterase, welches durch die Membranschädigung mit anschließenden Reparaturmaßnahmen ihr Ziel erreicht. Die Zielzelle muss über vermehrte Endozytose die Läsion schließen um eine Membranstabilität und ein Membranpotentialverlust zu vermeiden. Darüber kann das Granzym-B eindringen und als Protease seine direkt und indirekt zytotoxischen Wirkungen entfalten, wie die Apoptose zu induzieren. Granzym-B selbst hat dabei auch eine Membran-perforierende Komponente, welche hauptsächlich bei Bakterien, Pilzen und Tumoren zum Einsatz kommt. Diese Prozesse finden ähnlich in der (Memory-)T-Zell-Interaktion statt [5, 97, 98, 122].

Es gibt zahlreiche weitere Apoptose-induzierende, beziehungsweise zytotoxische Komplexe, welche auf NK-Zellen entdeckt worden sind. Fas und Fas-Ligand gehören zur Tumornekrosefaktor-6-Familie (TNFRSF6). Der Fas Rezeptor (CD95) kommt auf verschiedenen Körperzellen vor, wie B- und T-Lymphozyten, sowie Hepatozyten. Nach Bindung des von NK-Zellen exprimierten FAS-Liganden wird über eine Signalkaskade die Kaspase-Aktivität reguliert, was schließlich über kaspase-aktivierbare DNase zu Aufspaltung der DNS führt. Die Zelle wird in den programmierten Zelltod geschickt [69]. Ein weiterer Weg kann durch den TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL oder TNFSF10) gesteuert werden. TRAIL bindet dabei an sogenannte Death-cell-Rezeptoren über welche letztendlich ebenfalls die Apoptose induziert wird [168]. Im Zusammenspiel mit der humoralen Immunantwort können NK-Zellen auch Zielzellen erkennen und lysieren, welche vorher von IgG gebunden wurden. Diese antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) führt ebenfalls über Exozytose zur Zytolyse. Dieser Prozess der antikörperabhängigen Zytotoxizität wird im humanen Modell durch den Fc- γ -RIII-Rezeptor (CD16) ausgelöst. Die Fc-Domäne gebundener Antikörper (gebunden an infizierte Zielzellen) wird erkannt [7, 92, 167].

Die direkt antivirale Komponente konnte zum Teil schon unmittelbar beobachtet werden. Im humanen Modell konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen sowie deren Subpopulationen nach einer Infektion mit humanen Zytomegalie Viren (HCMV) expandieren. Es besteht Unklarheit, ob dieser Prozess klonal (analog T-Zellen) ist [65-67, 95]. Dafür muss das HCM-Virus

(HCMV) ebenfalls auch zielsicher erkannt werden. Bei einer viralen Infektion führt die Erkennung zur Aktivierung von NK-Zellen. Dies ist im murinen Modell vom aktivierenden Rezeptor Ly49H abhängig [45].

Besonders die Rezeptor-Interaktion ist beachtenswert. Bei T-Zellen braucht der T-Zellrezeptor-Komplex (TCR) eine immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) tragende CD3 Rezeptor-Untergruppe um eine ganzheitliche Signalübertragung durchzuführen. Bei NK-Zellen, welche kein CD3 tragen, brauchen die Ly49 Rezeptoren ebenfalls das ITAM tragende Signalmolekül DAP12 um eine volle Aktivierung zu erreichen [138].

Zell-Zell Interaktion

Die immunmodulatorischen Funktionen werden zum Teil über lösliche humorale Mediatoren und zum Teil von NK-Zellen direkt vermittelt. Dieser Prozess wird crosstalk genannt und ist besonders im Verbund mit den dendritischen Zellen (DCs) untersucht. Über eine Kopplung und einen Signalaustausch kann der jeweils andere Partner dieser Interaktion beeinflusst werden. Auch für andere Zellen ist diese Ko-Stimulation entscheidend, wie für die T-Zell vermittelte Immunantwort. Beim Menschen spielt CD56 eine besondere Rolle in der Zell-Zell Adhäsion. Diese Verbindung wird auch als NK-Zell-spezifische Immunsynapse bezeichnet [117].

NK-Zellen können generell auch selbst als Antigen-präsentierende Zellen (APCs) wirken. Unter spezifischen Aktivierungsbedingungen können sie über eine Hochregulation von MHC-II, CD80 und CD86 Mechanismen der Antigenaufnahme, -Prozessierung und -Präsentation temporär ausüben und somit T-Zellen aktivieren [70].

Weitere Zell-Zell-Interaktionen sind bekannt und in ihrer Funktion beschrieben. MHC-I ist nicht der einzige Ligand für inhibitorische Signale. Weiterhin beschrieben sind in der Maus NKR-P1B und 2B4, sowie beim Menschen NKR-P1A, welche die NK-Zell-Aktivität mitbestimmen [96, 159].

Alle diese Prozesse zeigen die Komplexität der direkten zytotoxischen und indirekten regulatorischen NK-Zell-Funktionen gegen eine Vielzahl von syngenen und allogenen Zellen.

3.2 Immunmodulierende Zytokine

Zytokine spielen eine wesentliche Rolle in vielen Teilen des Immunsystems, wie bei der Entwicklung, Differenzierung und der Toleranzentwicklung von Immunzellen. Besonders IL-2, IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 sind entscheidend für die Aktivierung, Reifung und das Überleben von NK-Zellen [105, 108]. Zytokine sind meist glykolysierte Protein-Makromoleküle. Sie können innerhalb des Körpers frei zirkulieren und entfalten dabei ihre biologische Aktivität meist lokal am Bildungsort. Als lösliche Mediatoren haben sie eine eher geringe Halbwertszeit und vermitteln somit ihre modulatorische Wirkung eher autokrin oder parakrin. Die Steuerung von Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Aktivität von Zellen des hämatopoetischen Systems, allgemein die Chemotaxis, sowie die Kontrolle und Regulation der Apoptose gehören zu ihrem Aufgabengebiet.

Zytokine werden von Zellen des Immunsystems gebildet um die komplexen Abläufe zu regulieren. Im Besonderen sind dies Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, NK-Zellen und Fibroblasten [9, 120]. Nach gängiger Auffassung kann man Zytokine in fünf große Familien einteilen: die Interferone, die Interleukine, die Wachstumsfaktoren, die Tumornekrosefaktoren und die Chemokine [120].

Die Familie der Interferone besteht aus Interferon α , β (Typ I) und γ (Typ II). Ihre immunmodulatorischen Wirkungen vermitteln sie über eine Aktivierung von Lymphozyten, eine Störung des Virusreplikationszyklus, sowie eine antiproliferative und teilweise zytotoxische Wirkung. α -Interferon wird zum Teil von Monozyten gebildet und aktiviert Effektorzellen wie T-Lymphozyten und NK-Zellen. β -Interferon wird von Fibroblasten gebildet und hat ähnliche Wirkungen. Interferon- γ ist wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr und wird von Makrophagen, NK-Zellen, T-Lymphozyten (Th1 und CTL) und Dendritischen Zellen (DC) gebildet. Die Wirkungen sind mannigfaltig, wobei die wichtigsten Funktionen in folgender stichpunktartiger Aufzählung zusammengefasst sind [129, 132].

- Aktivierung von NK-Zellen, T-Lymphozyten, Makrophagen
- Förderung von Adhäsion und damit Förderung der Leukozyten-Migration

- Verstärkung der Antigen-Präsentation
- Förderung der Immunglobulin-G Produktion von Plasmazellen
- Ausdifferenzierung von TH1-Lymphozyten aus CD4 T-Lymphozyten
- Förderung der Bildung von antibakteriellen Sauerstoff-Radikalen und Stickstoffmonoxid

Die Familie der Interleukine kann in mehrere Subfamilien eingeteilt werden. Hierzu gehören die Gruppe der IL-2 Rezeptor (IL-2R, CD132) tragenden, sogenannten common- γ -chain, Interleukine oder die Familie der IL-10 Zytokine. Die common- γ -chain oder CD132 ist ein Glykoprotein auf der Zellmembran. Es gehört zur Familie der Typ I Interferon Rezeptoren und wird neben mehreren anderen Rezeptoren von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 verwendet. Die IL-10 Familie und ihre Wirkungen sind ebenfalls pleiotrop. Hauptsächlich wirken diese inhibierend auf immunologische Prozesse.

IL-2 ist der hauptsächliche Wachstumsfaktor von T-Zellen. Es wird größtenteils von CD4 T-Lymphozyten gebildet und steuert die Proliferation und Differenzierung von beispielsweise NK-Zellen, B- und T-Lymphozyten, sowie die Produktion weiterer Interleukine, Interferone und Wachstumsfaktoren. Auch ein direkter Einfluss auf die Zytotoxizität von Makrophagen konnte gezeigt werden. Über die IL-2 Dosis kann auch die Aktivität von NK-Zellen gesteuert werden. Hohe Dosen (100.000 U/ml) erzielen eine starke Aktivierung, während niedrige Dosen eher ein verbessertes Überleben der NK-Zellen begünstigen [46]. Frühzeitig konnte in Tierexperimenten auch die IL-2 Wirkung auf die Ausdifferenzierung von Knochenmark-Vorläuferzellen gezeigt werden [123].

Ein besonderes Augenmerk der Experimente dieser Arbeit lag auf IL-15. Es ist ein Wachstumsfaktor aus der common- γ -chain tragenden Gruppe. Hauptsächlich wird es von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen (DC) nach Ligandenbindung gebildet [49, 161]. Dabei steuert es die T-Zell und NK-Zell-Entwicklung und Reifung, sowie die Differenzierung der Natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen) und CD8 Gedächtnis T-Zellen [162]. Besonders in der späten Ausreifung der hämatopoetischen Vorläuferzelle zur humanen NK-Zelle ist IL-15 involviert [10]. IL-15 spielt ebenfalls eine Rolle in der Apoptose. Außerdem reguliert es die Mastzellreifung aus basophilen

Granulozyten und die Homöostase von NK-Zellen scheint ebenfalls IL-15 abhängig zu sein. Knockout Mäuse, welche keinen IL-15 Rezeptor tragen, besitzen nachweislich keine NK-Zellen [88, 94]. Der IL-15 Rezeptor Komplex (IL-15R) ist analog zum IL-2 Rezeptor aufgebaut und vermittelt ebenfalls Wachstums- und Reifungssignale. Die β - (CD122) und γ -Kette (CD132) sind dem IL-2 Rezeptor identisch. IL-15 bindet an eine spezielle α -Kette, die IL-15-Rezeptor- α -Kette. Die trans-Präsentation dieses Rezeptors in der Zell-Zell-Interaktion ist Gegenstand kontroverser wissenschaftlicher Diskussion [64].

3.3 Graft-versus-Lymphom Effekt (GvL) und Graft-versus-Host Erkrankung (GvHD)

Für einen Therapieerfolg der allogenen hämatopoetischen Knochenmarktransplantation (KMT) oder Stammzelltransplantation (SZT) bei hämatologischen Neoplasien des Menschen sind neben der Radiotherapie und Chemotherapie maßgeblich die Spender-Immunzellen verantwortlich. Diese vermitteln einen kontinuierlichen antitumoralen Graft-versus-Leukämie (GvL) Effekt. Neben der adaptiven Immunität der Effektor-T-Zellen kommt hierbei auch den NK-Zellen eine wichtige Rolle zu. Nach einer Knochenmarktransplantation rekonstituieren NK-Zellen zusammen mit Monozyten sehr frühzeitig [8, 27]. Aktuelle Studien legen nahe, dass allogene NK-Zellen bei der Stammzelltransplantation einen protektiven Graft-versus-Leukämie Effekt vermitteln, ohne Komplikationen einer Graft-versus-Host Erkrankung auszulösen [116]. Neueste Daten belegen darüber hinaus eine große Heterogenität der NK-Zellen mit funktionell unterschiedlichen Eigenschaften einzelner Subpopulationen. So ist beschrieben, dass NK-Zellen dem von T-Zellen ausgelösten GvHD-Effekt positiv entgegenwirken können. Dies geschieht vermutlich durch eine direkte Beeinflussung von T-Zellen und APC, wie dendritischen Zellen.

3.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

NK-Zellen sind hinsichtlich der klinischen Anwendung aufgrund ihres großen zytotoxischen Potentials eine vielversprechende Zellpopulation für die Therapie gegen Krebszellen. Basierend auf Voruntersuchungen in Maus-Modellen, ist bekannt, dass NK-Zellen nach allogener Transplantation

frühzeitig rekonstituieren, einen GvL-Effekt vermitteln und in gewissem Umfang protektiv gegen eine GvHD wirken können [127]. Es war zu Beginn dieser Promotionsarbeit in diesem Zusammenhang noch nicht untersucht, inwieweit einzelne NK-Zell-Subpopulationen mit oder ohne vorherige/r Zytokin-Stimulation für die Lymphom-spezifische Immunantwort, besonders im Rahmen einer allogenen Knochenmarktransplantation, verantwortlich sind [110].

In dieser Promotionsarbeit sollten die Grundlagen der Generierung, Stimulation sowie die immunmodulatorischen und antitumoralen Wirkungen von Zytokin-stimulierten NK-Zellen *in vitro* und *in vivo* untersucht werden.

Insbesondere sollte die antileukämische Wirksamkeit von IL-15 aktivierten NK-Zellen analysiert werden. Als Tumormodell diente ein murines diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom der Balb/c-Maus, das sog. BCL-1-Lymphom. Nach retroviraler Transfektion der BCL-1-Zellen (BCL-1-Luc⁺gfp⁺) konnte die Tumorausbreitung mit Hilfe der eigens neu etablierten Biolumineszenz-Bildgebung (Bioluminescence Imaging, BLI) *in vivo* semiquantitativ gemessen werden. In dieser Arbeit sollte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe „Zelluläre Selektionsmechanismen in B-Lymphozyten“ (Leiter: Herr Professor Thomas Winkler, Lehrstuhl für Genetik, FAU Erlangen-Nürnberg) das BLI auf das BCL-1-Luc⁺gfp⁺ Tiermodell transferiert und etabliert werden.

BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen können von allogenen C57BL/6 NK-Zellen eliminiert werden. Bislang nicht bekannt war, welchen Effekt eine IL-2 oder IL-15-Stimulation auf die Tumorzellelimination von NK-Zellen hat. In Anbetracht unserer Vorerfahrungen sollte die Aktivierung mit IL-15 zu einer Zunahme des Anteils aktiver CD11b⁺ NK-Zellen führen. Resultierend wäre eine höhere zytotoxische Wirkung zu erwarten. Neben der Evaluation der IL-15 aktivierten NK-Zellen *in vitro* sollten Interleukin-stimulierte NK-Zellen in Lymphom-tragende Mäuse in unterschiedlicher Dosis und zu verschiedenen Zeitpunkten transferiert werden, um einen antitumoralen Therapie-Effekt zu beobachten. Das Ansprechen der Therapie sollte mittels BLI-Verfahren im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe analysiert werden.

Schließlich wurde der Einsatz von NK-Zellen in der GvL- und GvHD-Reaktion untersucht. Bisher war noch wenig über die grundlegende Rolle von NK-

Zellen und deren Subpopulationen in der antileukämischen Reaktion nach allogener Knochenmarktransplantation bekannt. Anhand verschiedener *in vitro* Experimente sowie eines tierexperimentellen Graft-versus-Lymphom Mausmodells wurde sich diesem Thema in der vorliegenden Arbeit genähert. Die im Rahmen dieser Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse sowie die im weiteren Verlauf darauf aufbauenden Ergebnisse der Arbeitsgruppe tragen wesentlich zum Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge der antileukämischen Reaktion nach allogener Knochenmarktransplantation bei.

4 Material und Methoden

Länderkennungen sind nach ISO-3166-Kodierliste angegeben.

4.1 Material

4.1.1 Reagenzien

Name	Zusammensetzung oder Hersteller
ACK-Puffer	NH ₄ CL 8,29g EDTA 0,037g KHCO ₃ 1g 1000ml H ₂ O
Assay-Diluent	5 ml FCS 45 ml 1fach PBS
Blocking-Puffer	10% FCS (fötales Kälberserum)+ 3% Mausserum
Coating-Puffer	3,57 g NaHCO ₃ 0,795 g Na ₂ CO ₃ 500 ml H ₂ O pH: 9,5
D-Luziferin	p-j-k GmbH, Kleinblittersdorf, DE
ELISA-Waschpuffer	100 ml 10fach PBS 900 ml H ₂ O 500 µl Tween
Kristallviolett Lösung	4g C3886, Sigma-Aldrich Lifescience, St. Louis MO, US 80ml Ethanol 100% 1000ml H ₂ O
Luziferin-Puffer	100ml 1fach PBS pH 8,5 + 2g NaOH+ 400ml 1fach PBS pH 8,0 + 16,8g NaHCO ₃
MACS-Lösung	NK isolation kit II, Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach DE
MACS-Puffer	0,744g EDTA 5g BSA 2ml 0,2%iges Na-Azid 1000ml 1fach PBS
R10	50ml FCS (fötales Kälberserum) 5ml MEMNEAA 5ml Penicillin/Streptomycin 5ml L-Glutamin 5ml Sodium Pyruvat 500 ml RPMI
Interleukin-2	Proleukine®, Chiron Corporation, Emeryville CA, US
Interleukin-15	PromoCell GmbH, Heidelberg, DE
Ketamin	Ketavet®, Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, DE, 1ml Ketamin = 100mg
Isofluran	Forene 100%, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, DE
Xylazin 2%	Rompun 2%®, Bayer Healthcare AG, Leverkusen, DE, 1ml Xylazin = 20mg

Tabelle 2: Reagenzien

4.1.2 Farbstoffe

Name	Konjugat	Hersteller und eingesetzte Verdünnung	
7AAD BD ViaProbe	-	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, DE	1:25
Annexin-V (AnxV)	FITC, PE, APC	ImmunoTools, Friesoythe, DE	1:20
DAPI	-	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	1:6000
PKH-26/67	-	Sigma-Aldrich Lifescience, St. Louis MO, US	

Tabelle 3: Farbstoffe

4.1.3 Antikörper

Alle hier aufgeführten Antikörper sind Anti-Maus Antikörper.

Name	Konjugat	Monoklonale Bindungsstelle	Hersteller und eingesetzte Verdünnung	
CD3	FITC	17A2	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, DE	1:200
CD3	PerCP, APC	145-2C11	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, DE	1:200
CD4	FITC, PE	YTS 191.1.2	ImmunoTools, Friesoythe, DE	1:200
CD8	APC	53-6.7	eBioscience, Frankfurt, DE	1:200
CD11b	FITC, PE; APC	M1/70.15.11.5/6	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach DE	1:200
CD11b	v450	M1/70	BD Horizon, Heidelberg, DE	1:200
CD19	FITC	1D3	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, DE	1:200
CD19	PerCP	6D5	BioLegend, San Diego, US	1:200
CD27	PE	LG.3A10	BD Bioscience Pharmingen	1:200
CD45.1	PerCP	A20	BioLegend, San Diego, US	1:200
CD45.1	APC	A20	eBioscience, Frankfurt, DE	1:200
CD45.2	PE, PerCP	104	BioLegend, San Diego, US	1:200
c-kit (CD117)	APC	2B8	eBioscience	1:200
DAPI	Keine	Keine	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE	1:6000
IFN- γ	PE, APC	XMG1.2	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, DE	1:200
NK1.1	PE-Cy7	PK136	BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, DE	1:200
NKp46	FITC	29A1.4	eBioscience, Frankfurt, DE	1:200

Tabelle 4: Antikörper

4.1.4 Tumorzelllinien

Name	Bezugsquelle
B16F10 wt Tumorzellen	ATCC, LGC Standards GmbH, Wesel, DE
BCL-1-Luc ⁺ gfp ⁺ -Tumorzellen	Prof. Dr. Matthias Edinger, Stanford University, Stanford CA, US

Tabelle 5: Tumorzelllinien

B16F10

Die murine Wildtyp (wt) B16F10 Zelllinie stammt von einem murinen malignen Melanom der Haut. Aus den Laboren der American Type Culture Collection (ATCC) stammend wurden sie für diese Arbeit vom Kooperationspartner Laurence Zitvogel (Institut Gustave Roussy, Villejuif, FR) bereitgestellt.

BCL-1-Luc⁺gfp⁺

Die B-Cell lymphoma Line-1 (BCL-1) enthält aus Balb/c Mausstämmen gewonnene (gegenüber C57BL/6 NK-Zellen allogene) Lymphom-Zellen eines diffusen großzelligen Lymphoms der B-Zellreihe. Aus Voruntersuchungen ist bekannt, dass die Milz als primäre Tumorlokalisierung angesehen werden kann. An der Stanford University, Stanford CA, US, wurden diesen Zellen gentechnisch mittels eines retroviralen Vektors neue DNA Sequenzen zugefügt. Diese Abschnitte erlauben den Zellen die Bildung neuer Proteine, im Speziellen des green fluorescent protein (gfp⁺) und des Enzyms Luziferase (Luc⁺). Die Zellen wurden vom Kooperationspartner Prof. Dr. Matthias Edinger (Stanford University, Stanford CA, US) bereitgestellt. Die Passagen der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellkultur erfolgten *in vivo*. Eine *in vitro* Zellkultur der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen war technisch nicht möglich (siehe Kapitel 4.2.1, 4.2.12). In unterschiedlicher Anzahl wurden die BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen den Mäusen intravenös (i.v.) injiziert. Nach drei bis zehn Tagen Wachstum wurden an den Mäusen ein BLI durchgeführt.

4.1.5 Mausbestand und Benutzung

Stamm und Erscheinung	Bezugsquelle	CD45	Haplo-typ	MHC I (H-2)		MHC II	
				K	D L	IA	IE
Balb/c, albino (weiß)	Janvier, Le Genest-St-Isle, FR Alter: 6-12 Wochen Geschlecht: weiblich	CD45.2 (Ly5.2)	d	K ^d	D ^d L ^d	IA ^d	IE ^d
C57BL/6 (schwarz)	Janvier, Le Genest-St-Isle, FR Alter: 6-12 Wochen Geschlecht: weiblich	CD45.1 (Ly5.1)	b	K ^b	D ^b -	IA ^b	-

Tabelle 6: Mausstämme

Quelle modifiziert nach: http://www.proimmune.com/ecommerce/page.php?page=MHC_alleles

Die Versuchstiere wurden im Alter von acht bis zehn Wochen verwendet. Die Tierhaltung erfolgte gemäß den Richtlinien der Regierungsstelle Unterfranken im Franz-Penzoldt-Zentrum der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg. Nach Ablegen des „FELASA Category B“ Kurses und Bewilligung des Tierschutzantrags (54-2532.1-9/09) wurden die Experimente begonnen.

4.1.6 Verbrauchsmaterial

Name	Bezugsquelle
96-well Platten	Omnilab Falcon (Bremen, DE)
IFN- γ ELISA-Kit	BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA USA
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Neubauer Zählkammer	Hycor Biomedical Ltd., Penicuik, GB
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Siebe	OMNILAB-LABORZENTRUM GmbH & Co.KG, Bremen, DE
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE

Tabelle 7: Verbrauchsmaterial

4.1.7 Geräte und Software

Analyse-Software	GraphPad Prism 5.03, La Jolla, US Microsoft Excel 2003, Redmond, US
BLI-Gerät	CCD-Kamerasystem #C4742-98, Hamamatsu Photonics, Okayama City, JP
BLI-Software	SimplePCI, Hamamatsu Photonics, Okayama City, JP ImageJ 1.44p, Wayne Rasband, National Institutes of Health, US
Brutschrank	Hera cell 150, Thermo Scientific, Waltham, US
FACS-Gerät	BD FACS Canto II, San Jose CA, US
FACS-Software	BD FACS DIVA 6.1.1, San Jose CA, US Tree Star FlowJo 7.6.5, Ashland OR, US
MACS-Gerät	AutoMACS, Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, DE
Mikroskop	Axiovert 40C Zeiss, Göttingen, DE
SpectraMax 190 Photometer	Molecular Devices, Sunnyvale CA, US
Pipetten	eppendorf AG, Hamburg, DE
Sterilwerkbank	Hera safe, Thermo Scientific, Waltham, US
Zellsortierungsgerät „Sorter“	MoFlo Legacy, DakoCytomation, Hamburg, DE
Zentrifuge	Rotina 420R, Hettich, DE

Tabelle 8: Geräte und Software

4.2 Methoden

Im Folgenden sind die Methoden dieser Arbeit beschrieben. Methoden und Protokolle welche nicht unmittelbar zu den Ergebnissen dieser Arbeit beigetragen haben, sind dabei nicht explizit erwähnt.

4.2.1 Zellkultur

B16F10 Tumorzellen

Aufgetaute Wildtyp B16F10 Tumorzellen wurden *in vitro* bei definierten Umweltbedingungen, 37°C Umgebungstemperatur, 5% CO₂ Konzentration und circa 95% relativer Luftfeuchte im Kulturmedium R10 vermehrt. Jeden zweiten bis dritten Tag, je nach Zelldichte, fand eine Passagierung statt, um das Wachstum und das Kolonieverhalten konstant zu halten. Dabei wurden die adhärennten Tumorzellen vom Boden einer 75 cm² großen Zellkulturflasche mittels Trypsin (Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE) gelöst, ausgezählt und zu gleichen Teilen in neue Kulturflaschen eingebracht. Die daraus gewonnenen Zellen wurden für die folgenden *in vitro* Experimente eingesetzt. Unter regelmäßiger Kontrolle des Wachstumsverhaltens wurden bei Erreichen der Passage 80 neue Zellen einer früheren Passage aufgetaut und verwendet, ältere Zellen wurden verworfen.

BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Tumorzellen

Bei den nicht adhärennten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen war eine *in vitro* Zellkultur aufgrund der hohen Labilität technisch nicht möglich, da diese im Kulturmedium innerhalb eines Tages eine zu hohe Mortalitätsrate aufwiesen (nicht gezeigte Daten). Die Lymphom-Zellen wurden somit anfangs *in vivo* passagiert und im weiteren Verlauf mittels Kryokonservierung gelagert. Dieser Prozess des Einfrierens und Auftauens hatte keine negativen Auswirkungen auf das Wachstum und Verhalten der Tumorzellen (siehe Abbildung 13). Die Ausgangszellen wurden in Passage zwei bereitgestellt und im Zeitraum dieser Arbeit siebenmal passagiert um ein stabiles Wachstumsverhalten und eine weitere Anpassung der Zelllinie an unsere Mauspopulation zu erreichen. Nach 77 Tagen *in vivo* Wachstum der Passage 2 wurden die Zellen das erste Mal passagiert und eine Zellsortierung vorgenommen. Für die Passagierung musste ebenfalls ein neues Protokoll

erarbeitet werden. Aus den BLI-Messungen wurde die Maus mit dem am weitesten fortgeschrittenen Lymphom ausgewählt. Nach Entnahme der Splenozyten der Maus wurde durch eine anschließende spezielle Aufreinigung für die Zellsortierung eine Einzelzellsuspension gewonnen (siehe Kapitel 4.2.2). Diese Zellsuspension wurde ungefärbt dem MoFlo-Zellsortierungsgerät übergeben. Durch das grün-fluoreszierende Protein (gfp⁺) konnte die Population der relativ großen und heterogenen granulären Lymphom-Zellen ausgewählt werden. Diese BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen wurden mit einer Reinheit von stets über 90% in ein neues Gefäß sortiert und konnten nach weiteren Aufreinigungsschritten neuen Mäusen injiziert werden. Durch diese Selektion des jeweils am weitesten fortgeschritten Klons konnte das Wachstum in allen Balb/c Versuchstieren bis Passage 7 verbessert und stabilisiert werden.

4.2.2 Einzelzellaufreinigung

Der euthanasierten Maus wurde das entsprechende Organ mit der zuvor definierten Zellpopulation entnommen, wie die Milz, die inguinalen Lymphknoten, die Lunge oder das Knochenmark. Das Gewebe wurde in Petrischalen kurz mit 70-prozentigem Ethanol und danach mit R10 Medium gereinigt. Daraufhin wurde es zerkleinert und durch ein 100µm Sieb filtriert. Die entstehende Einzelzellsuspension wurde durch mehrere Behandlungsschritte, wie Erythrozytenlyse mittels ACK Puffer und drei Waschgänge mit R10 inklusive Zentrifugation zur arbeitsfertigen Einzelzellsuspension.

4.2.3 Bestimmungen der Zellzahl

Die Anzahl der zur Verfügung stehenden Zellen in dieser Einzelzellsuspension wurde mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Durch eine Färbung mit 0,1% Trypanblau-Lösung (Invitrogen, Darmstadt, DE) im Verhältnis 1:10 war es möglich, die Zellen unter dem Mikroskop gut zu erkennen und nicht-vitale Zellen beim Zählen auszuschließen, da sich diese vollständig mit Trypanblau angefärbt darstellten. Zehn Mikroliter der entstehenden Verdünnung wurden in die Neubauer Zählkammer eingebracht und anschließend erfolgte die dreimalige Bestimmung der Zellzahl in drei von

neun Großquadraten (x). Die Zellzahl konnte anhand der folgenden Formel berechnet werden.

$$\text{Zellzahl (gesamt)} = \frac{x_1 + x_2 + x_3}{3} * 10 * 9 * y$$

Der Mittelwert der drei Auszählungen wurde multipliziert mit dem Faktor zehn, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor von neun und multipliziert mit dem Ausgangsvolumen in Mikroliter (y in μl).

4.2.4 Magnetic cell separation (MACS)

Die entstandene Einzelzellsuspension aus dem Gewebe (Milz), enthielt alle Zellen, welche auch im Ausgangsorgan vorhanden waren. Um selektiv weiter mit NK-Zellen der Milz arbeiten zu können, schloss sich ein magnetic activated cell sorting (MACS®) an. Dabei wurden mittels eines vorgefertigten Biotin Cocktails aus dem NK isolation kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, DE) alle in der murinen Zellsuspension enthaltenen Zellen, wie T-Zellen, B-Zellen, DCs, Granulozyten, Makrophagen und Reste der Erythrozyten mit Biotin markiert. Nach anschließender Inkubation mit magnetischen Anti-Biotin Microbeads wurden diese Zellen beim Durchfluss durch eine Magnetsäule (MACS-Säule) gebunden und aussortiert. Dies stellt eine Negativ-Selektion dar und ermöglicht die Gewinnung von unmarkierten, unberührten (untouched), nicht-voraktivierten NK-Zellen.

4.2.5 Zytokin-Stimulation

Die so gewonnenen NK-Zellen wurden weiter *in vitro* mit Zytokinen stimuliert. Dafür wurde in jede Vertiefung einer 96-well Platte eine definierte Anzahl an Zellen und eine definierte Menge Medium mit entsprechender Zytokinkonzentration eingebacht. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und für weitere Experimente gewaschen und erneut ausgezählt. Die Überstände wurden abgenommen und für spätere ELISA Experimente bei minus 20°C eingefroren.

4.2.6 Durchflusszytometrie

Eine Detektion der Zelloberflächenmoleküle und damit eine Einordnung von Zelltypen und ihres Verhaltens wurde anhand des etablierten Verfahrens der Durchflusszytometrie vorgenommen. Ein Farbstoff (Fluorochrom) weist bei Aktivierung mittels Licht eine Fluoreszenz definierten Spektrums auf. Ein Fluorochrom gekoppelt mit einem monoklonalen Antikörper gegen eine entsprechende spezifische Bindungsstelle auf der Zelloberfläche ermöglicht es, die Zelle zu klassifizieren. Um hierbei eine unspezifische Bindung zu unterbinden, wurden die Bindungsstellen vorher mit einem Blocking Puffer blockiert. Beim Passieren verschiedener Laser des FACS-Geräts BD FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose CA, US) konnten gleichzeitig unterschiedliche Farben des Lichtspektrums gemessen werden. Die Auswertung und Darstellung erfolgte mit der Software FlowJo 7.6.5 (Tree Star Inc., Ashland OR, US). Zur Auswertung wurden definierte Zellpopulationen anhand einer individuellen Gating-Strategie ausgewählt und weitergehend untersucht. Dabei war eine grundlegende Klassifizierung bereits ohne Fluorochrom anhand der Zellgröße forward scatter (FSC) und der Zellgranularität sideward scatter (SSC) möglich. Weitere Einteilungen gelangen anhand des vorwiegenden Lichtspektrums. Diese zahlreichen Wellenlängenbereiche haben eine eigene Nomenklatur. Beispielhaft für in dieser Arbeit verwendete Fluorochrome stehen FITC für vorwiegend grünes Spektrum, PE für gelbes, PerCP, PE-Cy7 für überwiegend rotes Licht, APC für die blaue Fluoreszenz und v450 für hauptsächlich dunkelblaues bis violettes Licht. Diese Wellenlängenbereiche überschneiden sich zum Teil, was durch technische und mathematische Mechanismen ausgeglichen wurde.

4.2.7 Apoptose in der Durchflusszytometrie

Die Apoptose beschreibt den Mechanismus des programmierten Zelltods. Zellen, welche sich im Zelluntergang befinden, können ebenfalls durch Fluoreszenzen charakterisiert werden. Die Marker sind Annexin-V (AnxV) für eher apoptotische Zellen und Propidiumiodid (PI) oder 7-Aminoactinomycin (7AAD) für eher nekrotische Zellen. AnxV ist ein Farbstoff und agiert mit der Zelloberfläche, während PI oder 7AAD mit freiwerdender DNA in Interaktion

geht. Wenn die Zelle den Weg in die Apoptose einleitet, erzeugt die Veränderung in der Zellmembran eine vermehrte Bindung von AnxV. Diese Signalzunahme kann detektiert werden. Nach dem endgültigen Untergang der Zelle und Zerstörung der Membran werden die intrazellulären Bestandteile freigesetzt. Anschließend kann auch eine Zunahme des Signals von PI oder 7AAD beobachtet werden.

4.2.8 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die etablierte Methode des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) wurde für die Quantifizierung eines definierten Stoffes, bei dieser Arbeit vorwiegend IFN- γ , innerhalb einer Lösung verwendet. Dafür wurde in eine spezielle Platte eine Antikörper-Mischung, Antikörper 1:250 in Coating Puffer, für den zu bestimmenden Stoff eingebracht und inkubiert. Weiterhin wurden nach mehreren Wasch- und Inkubationsschritten die Proben und die Standardreihe mit ihren jeweiligen Verdünnungsstufen pipettiert. Die Messung erfolgte in einem Photometer bei 450nm und 570nm Wellenlänge. Die Auswertung erfolgte in Microsoft Office Excel 2003.

4.2.9 PKH Assay

PKH-26 oder PKH-67 sind fluoreszierende Farbstoffe. Ein PKH-Assay wurde als funktionelles Verfahren mit nicht-radioaktivem Farbstoff gewählt, um durchflusszytometrisch Zellen ohne Verwendung eines Antikörpers zu markieren und zu charakterisieren [57]. Dabei wurde direkt die Lipiddoppellayer Zellmembran eingefärbt. Dies dient der späteren Unterscheidung im FACS von Ziel- und Effektorzellen in einer gemeinsamen Inkubation und stört dabei nicht die Detektion anderer Oberflächenmarker und anderer Fluoreszenzen.

4.2.10 Zellzytotoxischer Assay

Ein zellzytotoxischer Assay ist eine weniger bekannte Methode zur Detektion der natürlichen Zytotoxizität von NK-Zellen gegen adhärente Tumorzellen. In eine flache 96-well-Platte wurden zunächst adhärente B16F10 Tumorzellen und anschließend NK-Zellen eingebracht. Jedes Well enthielt ein definiertes Effector: Target Verhältnis (E:T-Ratio), NK-Zellen zu Tumorzellen (20:1, 10:1,

5:1 oder 1:1) bei stets gleichbleibendem Volumen. Es wurden je nach Experiment $5 \cdot 10^3$ oder $10 \cdot 10^3$ Tumorzellen pro Well als Grundwert eingesetzt. Experimente der gleichen Art erfolgten stets nach dem gleichen Protokoll mit gleicher Anzahl an Tumorzellen pro Well und dem gleichen Zeitraum. Nach einem Zeitraum von 24 oder 48 Stunden und Entfernung des Lysats wurden die überlebenden noch vorhandenen adhärennten Tumorzellen mit 33-prozentiger Essigsäure aufgelöst, anhand des Farbstoffs Kristallviolett gefärbt und in einem SpectraMax 190 Photometer (Molecular Devices, Sunnyvale CA, US) bei 540nm gemessen. Der Vergleich und die Quantifizierung der Lyse erfolgte anhand der Messung der Vergleich-Wells (Basalwert), welche Tumorzellen ohne NK-Zellen enthielten. Die Berechnung wurde anhand folgender Formel vorgenommen.

$$Lyse [\%] = \left[1 - \frac{540nm \text{ gemessen}}{540nm \text{ basal}} \right] * 100$$

4.2.11 Zellzytotoxischer Assay im FACS

Die Methodik entspricht einem modifizierten Zellzytotoxischen Assay. Es wurde nach der Inkubation keine Kristallviolett Färbung vorgenommen. Die verbleibenden Zellen wurden gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Da die verwendeten B16F10 Melanom Tumorzellen adhärennt sind, wurde der Ansatz direkt in den FACS Röhrchen vorgenommen. Durch mehrmaliges Vortexen und unter Einsatz einer möglichst geringen Menge Trypsin wurden die Zellen vom Gefäß gelöst. Die Analyse erfolgte anhand der Farbstoffe AnxV und 7AAD, sowie der Antikörper gegen NK1.1 und CD3.

4.2.12 *In vivo* Biolumineszenz Bildgebung, BLI

Das hier vorgestellte Verfahren wurde vom Autor selbstständig in der Arbeitsgruppe etabliert und bedarf einer erweiterten Ausführung.

Fluoreszenz und Biolumineszenz sind ähnliche Verfahren der Naturwissenschaft. Die Biolumineszenz kommt in natürlicher Weise in der Familie der *Lampyridae*, der Leuchtkäfer, dem gewöhnlichen Glühwürmchen vor. Vor über 75 Jahren entdeckt wurden die Bestandteile der Biolumineszenz zuerst in nennenswerter Weise beim Krustentier *Cypridina*

hilgendorffii isoliert. Die Emission von Licht entsteht anhand eines Enzyms, welches ein Substrat metabolisiert und in der energiereichen Form zur Lumineszenz anregt. Das Enzym wurde Luziferase und das Substrat Luziferin benannt [3, 107]. Weitere Entdeckungen in der Chemie und Biologie führten zur Entwicklung der heutigen Biolumineszenz Bildgebung (Bioluminescence Imaging, BLI) [37]. Für die verwendeten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen wurde die aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* isolierte Luziferase verwendet. Das umgesetzte Substrat dieser Luziferase emittiert Licht im grünen Farbspektrum mit 562nm.

Die Etablierung dieser Methode der *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung (BLI) bei Mäusen erforderte eine lange ausführliche Erarbeitung eines exakten Protokolls und einer definierten Auswertung anhand eines eigenständig programmierten Makros. Ein Makro ist ein additives Software-Modul, welches Arbeitsprozesse automatisiert und individuelle Anpassungen erlaubt.

Zuerst wurden BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen (siehe Kapitel 4.1.4), in weiße Balb/c Mäuse injiziert. Nach einem definierten Zeitintervall für Migration und Proliferation folgte die BLI-Messung. Dafür wurde das in Lösung befindliche Substrat D-Luziferin (p-j-k GmbH, Kleinblittersdorf, DE) den betäubten Mäusen intraperitoneal (i.p.) appliziert. Nach etwa 10 Minuten Inkubationszeit zur Metabolisierung des Luziferins konnte die unmittelbar resultierende Biolumineszenz mit einer auf minus 80°C gekühlten zweidimensionalen CCD-Kamera (Cooled Charge-coupled-device Camera) (CCD-Kamerasystem #C4742-98, Hamamatsu Photonics, Okayama City, JP) in einer lichtdichten Kammer registriert werden.

Im dem biochemischen Prozess wird D-Luziferin unter Einfluss von Sauerstoff und Adenosintriphosphat (ATP) über Luziferyl-Adenylat zu Oxy-Luziferin. Dieses Oxy-Luziferin ist hoch energetisch und setzt auf dem Weg in den Grundzustand Energie in Form von Photonen frei [42].

Der CCD-Bildsensor wurde 1969 von George Elwood Smith und Willard Sterling Boyle (Bell Laboratories, Murray Hill NJ, US) entwickelt. Ihnen wurde im Jahre 2009 dafür der Nobelpreis für Physik verliehen. Der CCD-Bildsensor ist ein Halbleiterelement, welches vermag, Photonen in elektrische Signale umzuwandeln. Auf minus achtzig Grad Celsius gekühlt detektiert es die auftreffenden Photonen über den definierten Zeitraum und

stellt dies als monochrome zweidimensionale Aufnahme dar. Die Auflösung des in dieser Arbeit verwendeten Geräts ist mit 168x128 Pixel verglichen zu heutigen Kamerasystemen sehr gering. Da mit 16-bit Farbtiefe abgespeichert wurde, konnte das monochrome Bild begrenzt auf 600x457 Pixel vergrößert werden. Die fehlenden Pixel wurden dabei aus der 16-bit Farbtiefe der umgebenden Pixel gleichmäßig interpoliert. Um die Lichtbilder wissenschaftlich exakt zu messen, wurde das bei CCD-Kameras angewandte Verfahren des Anti-Bloomings abgeschaltet. Blooming ist ein Prozess, bei dem das Photonensignal bei maximaler Sättigung des messenden Pixels auf benachbarte Pixel übergeht und damit streut. Dies ist deutlich in Teil B der Abbildung 2 zu erkennen. Das rechte Versuchstier wird durch die Vielzahl an ungerichteten Photonen des linken Versuchstiers bei maximal gemessener Sättigung von außen beleuchtet. Eine eigene Biolumineszenz ist nicht zu beobachten. Es gilt daher, eine maximale Sättigung der Aufnahmen zu vermeiden. Das deaktivierte Anti-Blooming bewahrt eine Linearität zwischen dem tatsächlichen und dem aufgenommenen Signal, führt allerdings zu einer höheren Heterogenität der Aufnahme. Das Blooming ist wichtig für das Verständnis und die Evaluation der entstandenen Lichtbilder. So ist es möglich, dass auch Anteile außerhalb der Konturen des Versuchstiers eine Lumineszenz aufweisen. Im BLI-Signal gab es auch aufgrund anderer Faktoren wie eingesetzter Zellzahl, Gewebetiefe, eingesetzter Menge an Luziferin, Metabolismus der Maus inklusive deren Atembewegung und technischem Stand der Hardware eine erhöhte Heterogenität. Die Aufnahmen erfolgten mittels der Software SimplePCI (Hamamatsu Photonics, Okayama City, JP). Die Funktionsweise war analog der Benutzung eines Fotoapparats. Die Blende (Lichtmenge) und die Dauer der Belichtung (Lichtzeit) waren variierbar und brachten je nach Belichtung unterschiedliche Resultate hervor. Zu Beginn der Etablierung dieser Methode wurden die Versuchstiere mit Isofluran betäubt. Aufgrund der Bauart der Dunkelkammer war auf diese Weise nur die Messung eines einzelnen Versuchstiers in Inhalationsnarkose pro Zeiteinheit möglich. Im weiteren Verlauf erfolgte die gewichtsabhängige Anästhesie ohne Inhalationsapparatur mit Ketamin und 2% Xylazin, was eine simultane Aufnahme von zwei Mäusen erlaubte.

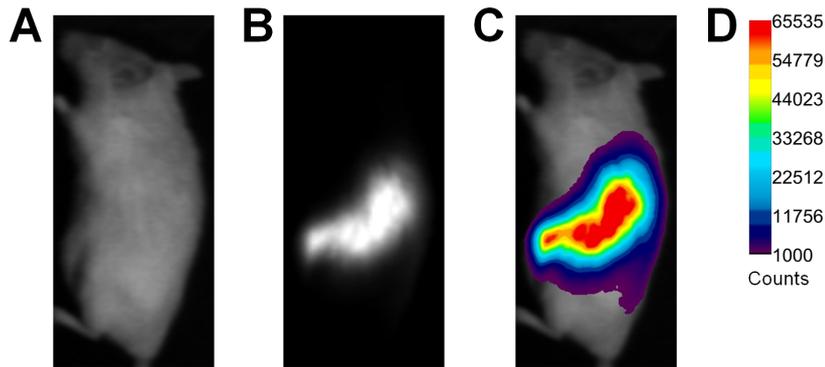


Abbildung 1: Biolumineszenz Überlagerungsbild

In vivo Biolumineszenz Imaging der Luziferase-bildenden Lymphom-Zellen nach Injektion von $0,4 \cdot 10^6$ aufgetauten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der achten Passage. Die Aufnahme erfolgte am 12. Versuchstag. Der gewichtsabhängig sedierten Balb/c Maus wurde 1,5 mg Luziferin i.p. injiziert. Die Aufnahme von links-lateral wurde mit dem Hellfeld-Bild (A) begonnen und bei ausgeschalteter Lichtquelle anschließend 200 Sekunden das Dunkelfeld-Bild (B) belichtet. Mit dem programmierten Makro und der Software ImageJ 1.44p wurde das berechnete Überlagerungsbild (C) inklusive Skala erstellt. Die Farbskala (D) des Überlagerungsbilds ist linear im Bereich von 1000 bis 65535 Counts.

Zu Beginn wurde eine Aufnahme der Dunkelkammer ohne Versuchstier vorgenommen und so das Hintergrundrauschen ermittelt. Bei den durchgeführten Versuchen war dies annähernd null. Nach der Positionierung des Versuchstiers in der Dunkelkammer wurde ein Bild unter Belichtung mit einer minimalen Lichtquelle aufgenommen. Auf diesem sogenannten Hellfeld-Bild war die Maus eindeutig zu erkennen. Anschließend wurde mit ausgeschalteter Lampe ein Dunkelfeld-Bild aufgenommen. Es entstand ein monochromes Bild in dem die weißen, belichteten Areale die gemessenen Photonen darstellten (siehe Abbildung 1B). Die BLI-Bildgebung erfolgte dabei stets von anterior sowie von links-lateral mit insgesamt vier Bildern pro Maus. Mittels des Programms ImageJ 1.44p (Wayne Rasband, National Institutes of Health, US) wurde aus dem Dunkelfeld-Bild und dem dazugehörigen Hellfeld-Bild ein skaliertes farbiges Überlagerungsbild erzeugt (siehe Abbildung 1C).

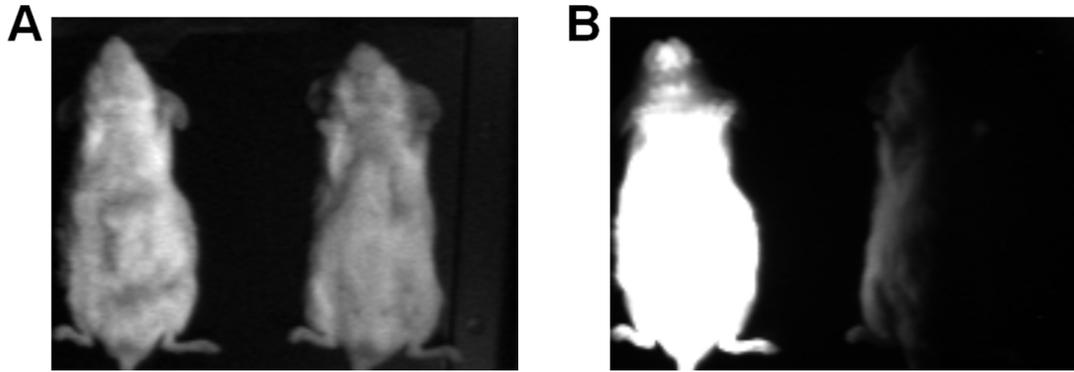


Abbildung 2: Blooming

Beiden Versuchstieren wurden $0,4 \cdot 10^6$ aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 8 injiziert. Am Tag 12 erfolgte die Aufnahme unter Injektionsnarkose mit Xylazin und Ketamin. Den gewichtsabhängig sedierten Balb/c Mäusen wurde 1,5 mg Luziferin i.p. injiziert. Die Aufnahme von anterior wurde mit dem Hellfeld-Bild (A) begonnen und bei ausgeschalteter Lichtquelle wurde anschließend für 200 Sekunden das Dunkelfeld-Bild (B) belichtet. Die dargestellten Lichtbilder sind die unveränderten Originalbilder der Messung ohne anschließende Bearbeitung. Der Grauwert des Dunkelfeld-Bilds ist linear im Bereich von 1000 bis 65535 Counts.

Um diesen komplizierten Prozess der Auswertung zu beschleunigen und bezüglich der Skala zu vereinheitlichen wurde eigens für den vorliegenden Versuchsaufbau ein 556 Codezeilen langes Makro in der Programmiersprache Java programmiert. Anhand des Makros inklusive grafischer Benutzeroberfläche (GUI, Graphical User Interface) konnten die circa 1300 für diese Arbeit aufgenommenen Bilder automatisiert verarbeitet werden. Die gemessene Einheit der entstandenen Aufnahmen in dieser Arbeit war Counts. Counts beschreibt dabei die relative Helligkeit eines Pixels im monochromen 16-bit Farbraum von minimal 0 bis maximal 65535. Die moderne Einheit der Photonen pro Quadratcentimeter pro Sekunde pro Steradian ($p/s/cm^2/sr$) war bei dem hier verwendeten BLI-Gerät noch nicht möglich. Steradian ist die SI-Einheit für einen definierten Winkel im dreidimensionalen Raum.

Eine Quantifizierung der entstandenen Aufnahmen erfolgte über die Messung der relativen Helligkeit in einer definierten Region, der Region of Interest (ROI). Die ROI wurde von dem erstellten Makro automatisch anhand des Photonensignals des Dunkelfeld-Bilds festgelegt und manuell kontrolliert (siehe Abbildung 3). Dabei wurde nach unter Berücksichtigung des Hintergrundsignals der absolute und relative Grauwert gemessen. Der absolute Grauwert enthält die addierten Grauwerte aller Pixel in der ROI pro Sekunde der Belichtungszeit in der Einheit Counts pro Sekunde (c/s). Die Werte der zwei Dunkelfeld Aufnahmen pro Maus (von anterior und links-

lateral) wurden dabei summiert um ein Gesamtbild des Versuchstiers zu bekommen. Für den relativen Grauwert wurde der Mittelwert der gemessenen ROI (mean gray value) bestimmt. Der Mittelwert bezieht sich ebenfalls auf die gesamte Maus und enthält Daten des anterior und des links-lateralen Dunkelfeld-Bilds und hat die Einheit Counts pro Pixel (c/px).

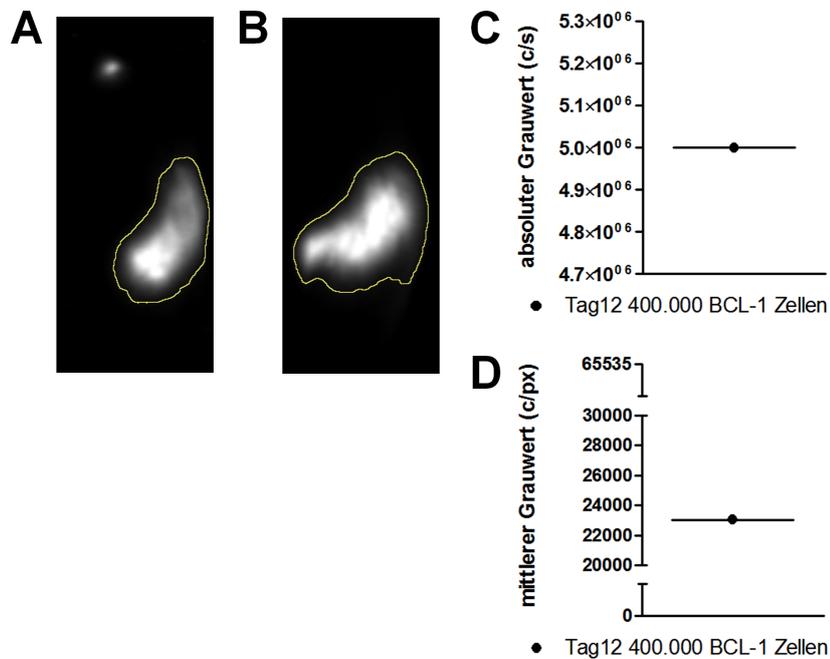


Abbildung 3: Biolumineszenz-Quantifizierung

Die zwei entstandenen Dunkelfeld-Bilder von anterior (**A**) und von links-lateral (**B**) der aus Abbildung 1 bekannten Maus wurden mittels der Software ImageJ 1.44p und dem selbst programmierten Makro automatisch mit jeweils einer Region of Interest (ROI) versehen. Die automatische Auswahl ist als gelber Rand zu sehen. Die rechten Scatterplot Darstellungen zeigen die Quantifizierungen dieser ROIs. In diesen Arealen wurden die freigesetzten Photonen mittels des absoluten Grauwerts (**C**) in der Einheit Counts pro Sekunde (c/s) oder des mittleren Grauwerts (**D**) in der Einheit Counts pro Pixel (c/px) gemessen.

4.2.13 *In vivo* Graft-versus-Lymphom und Graft-versus-Host

Experimente

Um die komplexen Vorgänge im Graft-versus-Lymphom (GvL) Modell nach Knochenmarktransplantation zu analysieren, wurden gemeinsame Experimente in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Die *in vivo* Tiermodelle zur Beobachtung und Auswertung einer GvL, sowie des GvHD-Effekts der Maus mussten neu etabliert werden. Die dabei verwendete Methodik sowie das Protokoll wurden maßgeblich von Dr. rer. nat. Irena Kröger etabliert.

Zur GvHD-Induktion wurde in Anlehnung an bereits publizierte Protokolle ein Schema erarbeitet [50, 80]. Zunächst mussten alle einzelnen Parameter überprüft werden. Es wurde daher zuerst die optimale Strahlendosis (letale Dosis) für den verwendeten Mausstamm ermittelt. Des Weiteren wurden Zell-Anreicherungsprozesse für die verschiedenen Zellpopulationen etabliert, um eine hohe Reinheit zu erzielen. Zur Bestimmung der erforderlichen Zellzahlen für die Transplantationen wurden Vorversuche durchgeführt und die geeigneten Zellzahlen ermittelt.

Das GvHD-Modell sieht demnach wie folgt aus: Die Empfängertiere werden letal bestrahlt. Am nächsten Tag werden aus allogenen Spendertieren Knochenmark und T-Zellen aufgereinigt und in die Empfängermäuse transplantiert.

Im GvL-Modell werden die aufgereinigten Zellen über einen Zeitraum von zwei Tagen transplantiert. Zur Beurteilung des Modells wird das BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom verwendet [50, 104]. Die Tumorausbreitung kann mit Hilfe des Biolumineszenz-Imaging (BLI) *in vivo* semiquantitativ ermittelt werden und somit der GvL-Effekt analysiert werden. Diese Messung wird alle 3-5 Tage durchgeführt. Das Überleben der transplantierten Mäuse wird täglich überprüft. Parallel erfolgt eine Beurteilung der klinischen Entwicklung der GvHD. Diese wird anhand eines international etablierten Scoring-Systems erhoben, in welchem Veränderungen von Tiermobilität, Körperhaltung, Gewicht, Haut- und Fellbeschaffenheit von 0-2 semiquantitativ bestimmt und die Scores addiert werden (siehe Tabelle 9) [149].

Weißer Balb/c Mäuse wurden als Empfänger subletal mit zu Beginn 8,5 Gy (später 8 Gy) bestrahlt. Diese Dosis ist durch vorherige Experimente titriert

worden. Nach einem Tag erfolgte der Transfer von $5 \cdot 10^6$ allogenen C57BL/6 Knochenmarkzellen und $0,2 \cdot 10^6$ BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen. Es handelte sich dabei um einen kompletten MHC-mismatch der C57BL/6 Knochenmarkzellen in Richtung Empfängermaus (siehe Kapitel 4.1.5). Am zweiten Tag nach Bestrahlung erfolgte in der Versuchsgruppe zusätzlich ein Transfer von $1 \cdot 10^6$ (später $0,6 \cdot 10^6$) Pan-T-Zellen um eine akute GVHD zu induzieren und zu verstärken. Die (Pan-)T-Zellen wurden mittels MACS® (CD3) positiv selektiert. Wenn in dem jeweiligen Experiment NK-Zellen eingesetzt wurden, wurden diese an Tag 2 aufgereinigt und injiziert.

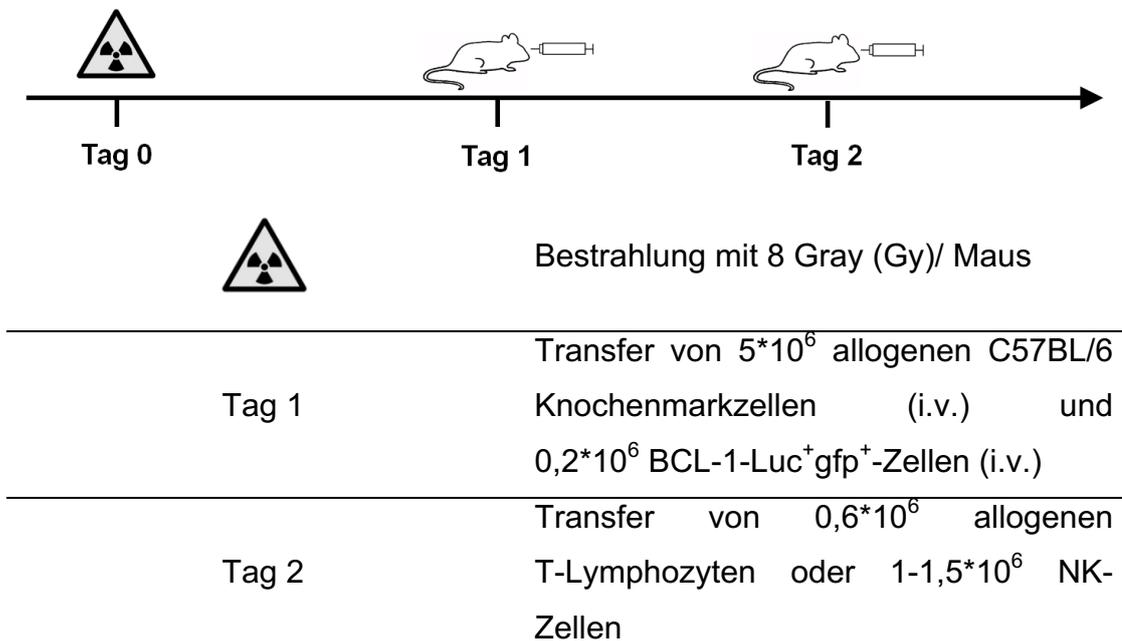


Abbildung 4: Graft-versus-Host Modell Schema

Um eine GvHD bei den Balb/c Mäusen zu induzieren, wurden die Versuchstiere mit 8 Gy bestrahlt und an Tag 1 nach Bestrahlung mit $5 \cdot 10^6$ allogenen C57BL/6 Knochenmarkzellen pro Maus, sowie im GvL Modell mit $0,2 \cdot 10^6$ BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen pro Maus transplantiert. An Tag 2 erfolgte in einer Gruppe der Transfer der $0,6 \cdot 10^6$ Pan-T-Zellen pro Maus, sowie -wenn verwendet - der Transfer von $1-1,5 \cdot 10^6$ NK-Zellen pro Maus.

Nach Transplantation wurden alle 2 Tage der von Cooke *et al.* erstmals beschriebene klinische GvHD-Score zur Bestimmung der akuten Graft-versus-Host Erkrankung ermittelt [34, 56]. Die Aufschlüsselung dieses Punktwerts wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Irena Kröger leicht abgewandelt (siehe Tabelle 9). Der jeweilige Grad der Ausprägung ergab den Punktwert. Grad 0 ergab den Punktwert 0, Grad 1 den Punktwert 1 und Grad 2 den Punktwert 2. Alle Punkte wurden für das jeweilige Versuchstier addiert, wobei das Versuchstier ab einem Score von ≥ 6 nach Tierschutzgesetz-konformen Bestimmungen euthanasiert wurde.

Verstorbene oder euthanasierte Mäuse wurden zur Auswertung mit dem Punktwert 6, oder dem zum Messzeitpunkt bestehenden Punktwert einbezogen. Zusätzlich zum Score wurde noch das Auftreten von Diarrhoe vermerkt. Zur Auswertung des Graft-versus-Lymphom Effekts erfolgten zeitnah mehrere BLI-Messungen an vorher definierten Zeitpunkten.

Kriterium	Grad 0	Grad 1	Grad 2
Gewichtsverlust	<10%	>10% bis <25%	>25%
Haltung	normal	gekrümmt in Ruhe	stark gekrümmt mit Bewegungseinschränkung
Aktivität	normal	leicht bis mäßig verändert	Bewegung nur nach Stimulation
Erscheinung Fell	normal	leicht bis mäßig struppig	stark struppig / vernachlässigte Fellpflege
Erscheinung Haut	normal	schuppig an Pfoten und Schwanz	kahle Stellen

Tabelle 9: Beurteilungskriterien des modifizierten klinischen GvHD-Score nach Cooke *et al.* [149]

Die Darstellung des GvHD-Scores der Experimente wurde im zeitlichen Verlauf einheitlich graphisch aufgetragen. Exemplarisch ist der Verlauf des Scores eines Experiments in Abbildung 5 dargestellt. Die obere rote Kurve stellt den Verlauf nach zusätzlichem adoptiven Transfer von T-Zellen nach Knochenmarktransplantation dar.

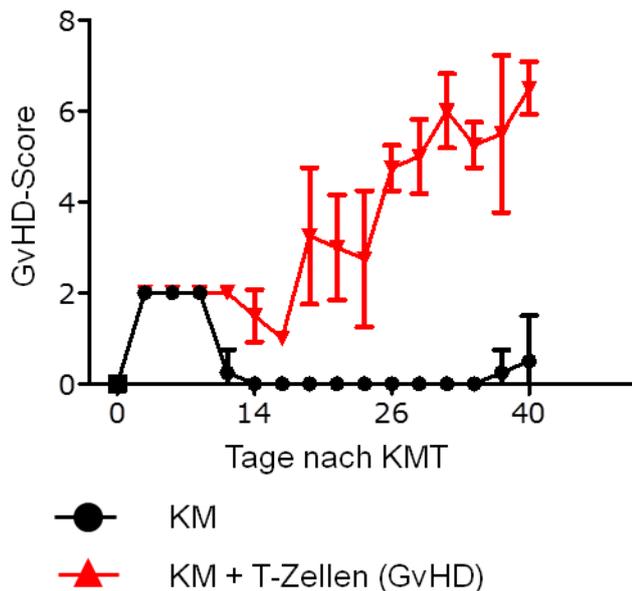


Abbildung 5: GvHD-Score

Balb/c Mäuse wurden mit 8 Gy bestrahlt und an Tag 1 nach Bestrahlung mit $5 \cdot 10^6$ allogenen C57BL/6 Knochenmarkszellen pro Maus transplantiert. Ein Kontrollgruppe (KM) wurde ohne weitere Intervention beobachtet. An Tag 2 erfolgte in der Versuchsgruppe (KM+T-Zellen) der Transfer von $0,6 \cdot 10^6$ Pan-T-Zellen pro Maus. Es wurde alle zwei Tage der GvHD-Score bestimmt. Der GvHD-Score wurde analog dem Punktwert der Tabelle 9 berechnet und graphisch dargestellt.

4.2.14 Statistische Analyse

Die Statistik und deren Darstellung wurde anhand des Programms Prism 5.03 (GraphPad Software Inc., La Jolla CA, US) vorgenommen. Das genaue statistische Verfahren wurde bei jeder Abbildungen separat mit angegeben. Innerhalb von Barplot Darstellungen erfolgte die Auswertung meist anhand eines einfaktoriellen (one-way) Varianzanalyse-Tests (ANOVA) inklusive Dunnets-Post-Test. Die Normalverteilung wurde stets anhand des Shapiro-Wilk-Tests berechnet und nicht explizit angegeben. Falls keine Normalverteilung vorlag, wurde ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau ist über den p-Wert einheitlich festgelegt (*= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$). Nicht signifikante Analysen (ns= $p \geq 0,05$) sind nicht durchgehend gekennzeichnet.

5 Ergebnisse

Die Zell-Generierung und -Aufreinigung aus murinen Splenozyten bildet die Basis dieser Arbeit. Im ersten Teil wurden die Veränderungen im Phänotyp, sowie das veränderte Verhalten der NK-Zellen nach Zytokin-Stimulation *in vitro* und *in vivo* untersucht. Für die Analyse der NK-Zell-Funktion ist eine sichere Methodik essentiell. Daher wurde zunächst das Protokoll der Zell-Aufreinigung geprüft, um eine verlässliche Konsistenz der Reinheit und Viabilität der gewonnenen NK-Zellen sicher zu stellen. Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit der Biolumineszenz Bildgebung (Bioluminescence Imaging, BLI, siehe Kapitel 4.2.11), die im Rahmen dieser Promotion vor Ort etabliert wurde. Im dritten Teil dieser Arbeit erfolgte die Anwendung der Methoden in einem GvL- und GvHD-Maus-Modell.

5.1 NK-Zellen in der Durchflusszytometrie nach MACS® Aufreinigung

NK-Zellen wurden meist aus der Milz von schwarzen C57BL/6 Mäusen gewonnen. Anschließend erfolgte eine magnetische Aufreinigung (MACS®) als Negativ-Selektion, welche alle unerwünschten Zellen herausfilterte (siehe Kapitel 4.2.2, 4.2.4). In der Durchflusszytometrie (FACS, siehe Kapitel 4.2.6) wurden die NK-Zellen auf ihre Viabilität und Reinheit kontrolliert. Anhand der in Abbildung 6A dargestellten Gating-Strategie konnten die NK-Zellen selektiert werden. Aus der Splenozyten Gesamtzellmorphologie wurde die Lymphozytenpopulation anhand von Zellgröße (FSC) und Granularität (SSC) bestimmt (Abbildung 6, linke Diagramme). Im folgenden Diagramm wurden künstliche Artefakte durch doppelt gemessene Zellen entfernt. Der Prozentsatz dieser entfernten Artefakte ist stets sehr niedrig und liegt meist bei unter 5%. Das dritte Diagramm in Abbildung 6 kennzeichnet die NK-Zellen aus der C57BL/6 Maus, an den für diese Mauslinie typischen Zelloberflächenmarkern NK1.1 und CD3. Der T-Zell-Marker CD3 dient zur Elimination von unerwünschten Natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT-Zellen). Die hier dargestellten 3,25% NK-Zellen der murinen Splenozytenpopulation entsprechen der physiologischen Konzentration von circa 4% NK-Zellen in der Milz der Maus. Im rechten Dichteplot Diagramm der Abbildung 6 sind die murinen NK-Zell-Subpopulationen angeordnet nach CD27 und CD11b dargestellt. Die CD11b⁺ Subpopulation zeigte sich in der Normalverteilung

stets als größte Gruppe. Diese muren NK-Zellen waren mit einem Anteil von circa 50% hauptverantwortlich für die Zytotoxizität. Die als immatur geltenden $CD27^+$, sowie die $CD27^+CD11b^+$ (doppelt positive Population, DP) entsprachen der physiologischen statistischen Verteilung - es waren stets weniger in der Anzahl, als die reifen $CD11b^+$ NK-Zellen und lagen zwischen 10 und 20 %. Sie zeigen sich verantwortlich für die immunmodulierende Zytokin-produzierende und regulierende Funktion der NK-Zellen. Über die doppelt negative (DN) Subpopulation ist wenig bekannt. Ihr Anteil variierte zwischen 0 bis 20%. Eigene Ergebnisse (nicht gezeigte Daten) lassen den Schluss zu, dass es sich bei diesen Zellen eher um überreife NK-Zellen handelt, die ihr spezifisches Oberflächenprofil herunter regulieren. Auch Zellen, welche sich im Prozess der Apoptose befinden, können sich so darstellen (nicht gezeigte Daten).

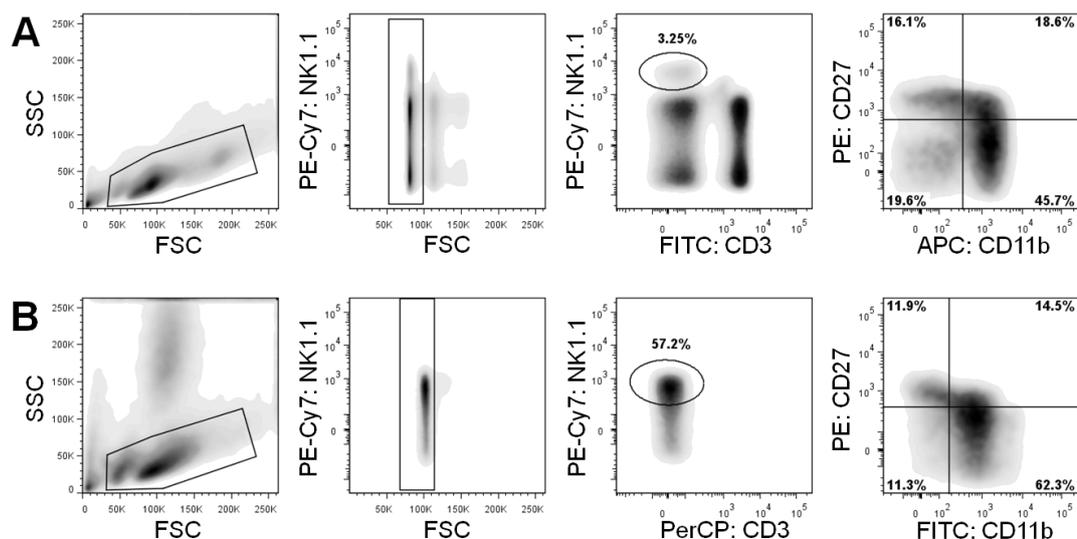


Abbildung 6: Anreicherung von NK-Zellen

Frisch isolierte murine C57BL/6 Splenozyten wurden mittels Einzelzellaufreinigung aus der Milz gewonnen und anschließend direkt durchflusszytometrisch gemessen (**A**) oder zunächst weiter mit magnetischer Negativ-Selektion zu NK-Zellen konzentriert (**B**). Die FACS Analyse erfolgte mit Antikörpern gegen NK1.1, CD3, CD27 und CD11b (siehe Kapitel 4.1.3). Die Abbildungen zeigen die Daten je einer repräsentativen Färbung aus insgesamt 26 Färbungen.

In der unteren Reihe der Abbildung 6B ist analog zu A eine Darstellung nach MACS® Aufreinigung zu sehen. Die im dritten Diagramm dargestellten angereicherten Zellen steigen auf 57,2% Reinheit an. Die Verteilung der Subpopulationen von Abbildung 6A und B repräsentiert die Normalverteilung aller Experimente der Arbeitsgruppe (nicht gezeigte Daten).

In MACS aufgereinigten Maus-NK-Zellen gibt es nur eine geringe Anzahl an Zellen, welche weder CD27 noch CD11 auf ihrer Oberfläche tragen (doppelt negative Zellen, DN). Je höher die Reinheit und Viabilität der NK-Zellen, desto weniger Zellen dieser CD27⁻CD11b⁻ Population sind zu erkennen.

5.2 Morphologie der NK-Zellen und Subpopulationen nach *in vitro* Zytokin-Stimulation

Nach einer erfolgreichen Aufreinigung der NK-Zellen folgte eine *in vitro* Zytokin-Stimulation. Hierbei wurde die unterschiedliche Ausprägung und Verteilung der Subpopulationen, sowie die Viabilität nach IL-15 Stimulation untersucht. Zum Vergleich diente die Stimulation mit IL-2. In Abbildung 7 sind Zytokin-stimulierte C57BL/6 NK-Zellen dargestellt, wobei zusätzlich die Viabilität der Zellen anhand der Farbstoffe AnxV und 7AAD dargestellt ist (Abbildung 7A und B, viertes Diagramm). Die NK-Zellen wurden im Kulturmedium R10 für 24 Stunden mit niedriger Dosis IL-2 (5000 U/ml), hoher Dosis IL-2 (100.000 U/ml) oder IL-15 (25 ng/ml) stimuliert. In der Abbildung 7A ist die Veränderung nach 24 Stunden *in vitro* Stimulation mit niedriger Dosis (5.000 U/ml) IL-2 zu erkennen. Die Reinheit der Zellen nahm dabei leicht zu, während die Viabilität nach 24-stündiger Inkubation abnahm. In frisch isolierten NK-Zellen waren stets über 90 % der Zellen lebendig (nicht gezeigte Daten). Nach 24-stündiger Stimulation mit IL-15 war die Reinheit nahezu unverändert, allerdings nahm die Viabilität der Zellen stark ab, was in Abbildung 7B dargestellt ist. Nur noch 29,8 % der ausgewählten NK-Zellen waren lebendig. Auch eine Dosisreduktion von IL-15 (25ng/ml auf 20ng/ml) zeigte identische Auswirkungen und führte gleichsam zu einer Abnahme der Viabilität (nicht gezeigte Daten). Diese Beobachtungen haben auch Einfluss auf die statistische Verteilung der Subpopulationen. Insgesamt wurden 26 durchflusszytometrische Messungen vorgenommen, von denen jeweils eine in Abbildung 7A und Abbildung 7B dargestellt ist. NK-Zellen in der CD27⁺ und DP Subpopulation waren in der IL-2 Gruppe signifikant zahlreicher als unstimulierte oder mit IL-15 stimulierte NK-Zellen. Die Verteilung der Subpopulationen ist dabei in der Abbildung 7C zu sehen.

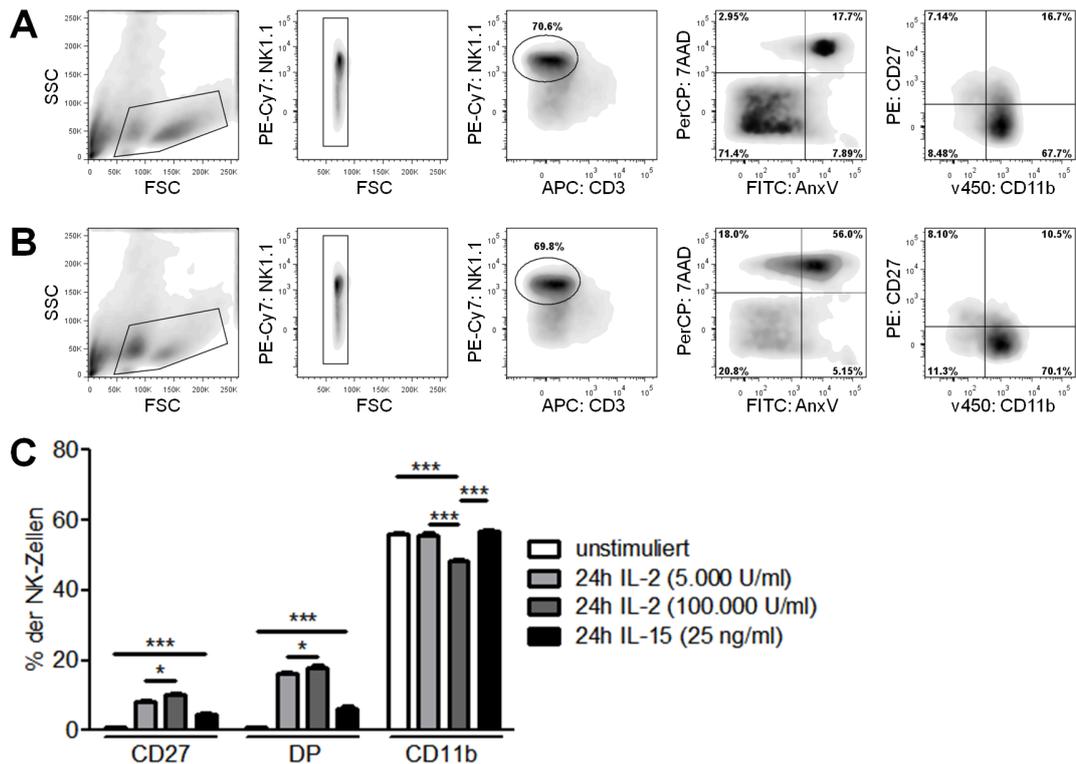


Abbildung 7: phänotypische Charakterisierung von NK-Zellen nach *in vitro* Zytokin-Stimulation

MACS aufgereinigte C57BL/6 NK-Zellen wurden nach 24h *in vitro* Stimulation mit 5.000 U/ml IL-2 (A) oder 25 ng/ml IL-15 (B) durchflusszytometrisch gemessen. Weiterhin wurde die statistische Verteilung der murinen Subpopulationen nach *in vitro* Zytokin-Stimulation (C) ermittelt. Dabei wurden zum Vergleich zwei weitere Gruppen, unstimulierte und mit 100.000 U/ml IL-2 stimulierte NK-Zellen, in die Analyse mit einbezogen. Die FACS Analyse erfolgte mit den Farbstoffen AnxV und 7AAD, sowie mit den Antikörpern gegen NK1.1, CD3, CD27 und CD11b (siehe Kapitel 4.1.2, 4.1.3). Die Abbildungen zeigen die Daten eines Experiments (A+B, jeweils n=1) oder 5 Experimenten (C, n=5). Die Signifikanz wurde mit one-way ANOVA-Test und Dunnetts-Post-Test berechnet (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001).

Die Darstellungen A und B stellen einen Überblick über 26 unabhängig durchgeführte Stimulationsexperimente dar. Die statistische Verteilung der Subpopulationen (C) wurde in fünf Experimenten analysiert. In der Gruppe der Hochdosis IL-2 stimulierten Zellen fiel eine signifikante Zunahme der CD27⁺ und DP Population gegenüber einer Abnahme der CD11b⁺ Population auf. IL-2 wirkt signifikant auf die Reifung von NK-Zellen. Auch die Differenzierung aus NK-Zell-Vorstufen wurde verstärkt, was an einem signifikant höheren Prozentsatz von CD27⁺ NK-Zellen in Abbildung 7C zu sehen ist. Die CD11b⁺ Gruppe war signifikant reduziert. Die höhere Anzahl an Vorstufen ist auch auf die gesteigerte Viabilität (Abbildung 7A und Abbildung 7B, viertes Diagramm) zurückzuführen. Die Viabilität der NK-Zellen war mit 20,8% nach IL-15 Stimulation manifest erniedrigt (Abbildung 7B, viertes Diagramm). Die verbleibenden überlebenden Zellen der IL-15

Gruppe zeigten eine Normalverteilung innerhalb der Subpopulationen. Unstimulierte NK-Zellen zeigten nach einer 24-stündigen Inkubation im Nährmedium ohne Zusätze alleinig CD11b⁺-Zellen auf. Die Viabilität der Zellen war deutlich reduziert (nicht gezeigte Daten).

5.3 NK-Zell-Funktion anhand IFN- γ

Zytokin-Stimulation (besonders mit hochdosiertem IL-2) beeinflusst neben dem Phänotyp auch die Funktionen der NK-Zellen. Sehr wichtige Effektorzellfunktionen sind die Immunmodulation und Regulation, sowie die direkte Zelltoxizität. Nach Generierung, Stimulation und Analyse der NK-Zellen, sowie deren Subpopulationen, folgte die Bewertung ihrer immunmodulatorischen Funktion mit Fokus auf die IFN- γ Produktion. In Abbildung 8 ist die Potenz Zytokin-stimulierter C57BL/6 NK-Zellen zur Interferon- γ -Bildung *in vitro* dargestellt. Die Zellen wurden zunächst gewonnen, magnetisch aufgereinigt und anschließend für 24 Stunden mit 5.000 U/ml IL-2 oder 25 ng/ml IL-15 stimuliert. Eine weitere Gruppe erhielt eine 48-stündige Stimulation mit 25 ng/ml IL-15. Anschließend erfolgte eine Quantifizierung anhand eines ELISA Assays. Nach 24-stündiger *in vitro* Stimulation ist ein signifikanter Unterschied der IFN- γ Konzentration in der mit 5.000 U/ml IL-2 stimulierten Gruppe sichtbar. Die IL-15 Stimulation zeigte dagegen weder nach 24- noch nach 48-stündiger Stimulation einen Unterschied bezüglich der IFN- γ Konzentration. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten. Die Ergebnisse korrelieren dabei mit den oben gezeigten Analysen zur Veränderung der Subpopulation nach Zytokin-Stimulation. Die eher immunmodulatorischen CD27⁺ und CD27⁺CD11b⁺ Subpopulationen waren nach IL-2 Stimulation signifikant erhöht (siehe Abbildung 7C) und produzierten analog signifikant mehr IFN- γ (siehe Abbildung 8). IL-15 scheint dagegen nicht die Produktion von IFN- γ zu induzieren. Auch der Aspekt, dass nach 24- und 48-stündiger IL-15 Stimulation signifikant weniger NK-Zellen lebendig waren (siehe Abbildung 7B, viertes Diagramm), beeinflusst dieses Ergebnis.



Abbildung 8: *in vitro* IFN- γ Produktion nach *in vitro* Zytokin-Stimulation

MACS aufgereinigte C57BL/6 NK-Zellen wurden 24h oder 48h *in vitro* mit entweder 5.000 U/ml IL-2 oder 25 ng/ml IL-15 stimuliert. Es folgte eine ELISA Quantifizierung der *in vitro* IFN- γ Konzentration. Die Barplot Darstellung beinhaltet Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2). Die Signifikanz ist mit one-way ANOVA-Test und Dunnets-Post-Test berechnet (***)=p<0.001).

5.4 NK-Zell-Funktion anhand ihrer Zytotoxizität

Eine weitere besondere Funktion der NK-Zellen als Effektorzellen ist ihre Zytotoxizität. In Abbildung 9 ist der zeitliche Verlauf anhand eines Experiments mit mehreren durchflusszytometrischen Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Analysiert wurde dabei die Viabilität der Tumorzellen *in vitro* per FACS mit den Farbstoffen AnxV und 7AAD und Antikörper gegen NK1.1 und CD3 eingesetzt. Die Methodik entspricht einem modifizierten Kristallviolett Assay (siehe Kapitel 4.2.11). Da die verwendeten B16F10 Melanom Tumorzellen plastikadhärent sind, wurden sie durch mehrmaliges Vortexen und unter Einsatz einer möglichst geringen Menge Trypsin gelöst und der Ansatz direkt in den FACS Röhrchen vorgenommen.

Im ersten Gate wurden die Tumorzellen anhand ihrer aus Vorexperimenten bekannten Morphologie (nach FSC und SSC, siehe Kapitel 4.2.6) ausgewählt. Die Darstellung ist dabei nicht vergleichbar mit den Darstellungen aus Abbildung 7A oder Abbildung 7B, da die Laserstärke und der Laserfilter (Kompensation) für die wesentlich größere Tumorzellpopulation angepasst wurden. Die veränderte Gating-Strategie besteht hier nur aus zwei Schritten. Im ersten Schritt wurden, wie im linken Fenster dargestellt, die Größe und Granularität ausgewählt. Im zweiten Schritt wurde innerhalb dieser Population das Gate nach den Farbstoffen AnxV und 7AAD festgelegt. Dieses Gate zur Differenzierung innerhalb der AnxV und 7AAD Populationen wurde für alle vier dargestellten Zeitpunkte exakt gleich gewählt.

Im Vergleich zu frischen Tumorzellen (nicht dargestellt) zeigte sich, dass innerhalb der ersten sechs Stunden der Großteil der Tumorzellelimination durch NK-Zellen bereits erfolgt ist. In der ausgewählten Tumorzellpopulation trugen nur noch 14,6% der Population weder AnxV noch 7AAD und waren damit vollständig lebendig (linker unterer Quadrant). 35,4% der Zellen befanden sich bereits im Prozess der Apoptose oder auf dem Weg dahin. Sichtbar wurde dies anhand der AnxV⁺7AAD⁻ Population (rechter unterer Quadrant). AnxV⁺7AAD⁺ tragende Zellen oder Zellbestandteile markieren die zeitlich später einsetzende Nekrose. Nach 6 Stunden waren bereits 47,1% der Tumorzellen in diesem Stadium angelangt und kurz vor dem endgültigen Zelltod. Der Anteil an AnxV⁻7AAD⁺-Zellbestandteilen ist in allen Darstellungen aufgrund geringer Ausprägung zu vernachlässigen. Markiert werden keine vollständigen Zellen, sondern zelluläre Residuen, da 7AAD an DNA bindet und diese angefärbt sichtbar werden lässt (siehe Kapitel 4.2.6). Später ist die zunehmende Zerstörung der B16F10 Tumorzellen zu erkennen. Das Maximum an apoptotischen Zellen war mit 36% nach 18h erreicht. Im weiteren zeitlichen Verlauf gingen immer mehr Zellen in den programmierten Zelltod. Hier war ein eindeutiger Shift, eine Bewegung der Populationen im Diagramm, zu erkennen. Während nach 18h Stunden noch fast 10% lebendig und 26% apoptotisch waren, waren nach 24-stündiger Stimulation nur noch 4,84% lebendig und 23,6% in der Apoptose. 68,3% der Zellen waren bereits in der Nekrose angelangt. Nach 48-stündiger Stimulation stabilisierte sich dieser Zustand ohne wesentliche Veränderungen.

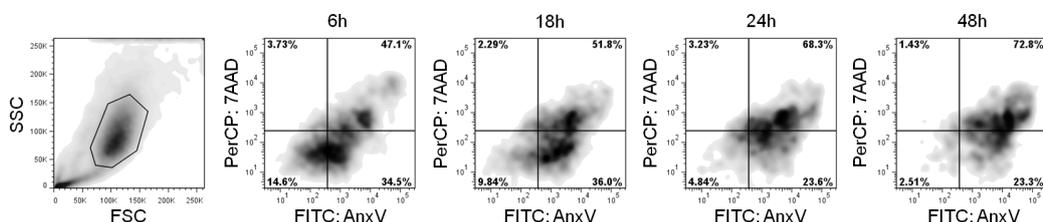


Abbildung 9: *in vitro* Lyseverlauf von *in vitro* Zytokin-stimulierten NK-Zellen

Nach 24h *in vitro* Vorstimulation mit 5.000 U/ml IL-2 wurden C57BL/6 NK-Zellen mit B16F10 Melanomzellen über unterschiedliche Zeitdauern *in vitro* inkubiert. Die E:T-Ratio war dabei konstant 10:1. Die FACS Analyse erfolgte mit den Farbstoffen AnxV, 7AAD und den Antikörpern gegen NK1.1 und CD3 (siehe Kapitel 4.1.2, 4.1.3). Die Abbildungen zeigen die Daten einer repräsentativen Versuchsreihe aus insgesamt 3 Experimenten (n=1).

5.4.1 Veränderung der *in vitro* Lysekapazität von NK-Zellen nach Zytokin-Stimulation

Die Stimulation mit unterschiedlichen Zytokinen führt über verschiedene Mechanismen zu einer veränderten Aktivierung und Zytotoxizität der NK-Zellen. Im Besonderen die Veränderungen nach Stimulation mit IL-15 wurden untersucht.

In eigenen Vorexperimenten ergaben sich Hinweise darauf, dass die Zytotoxizität von IL-15 stimulierten NK-Zellen der von IL-2 stimulierten Zellen überlegen sein könnte. In der statistischen Auswertung von 11 unabhängigen Experimenten musste diese Hypothese verworfen werden. Auch unterschiedlich lange Intervalle der IL-15 Stimulation konnten nicht den erwarteten Effekt erzielen.

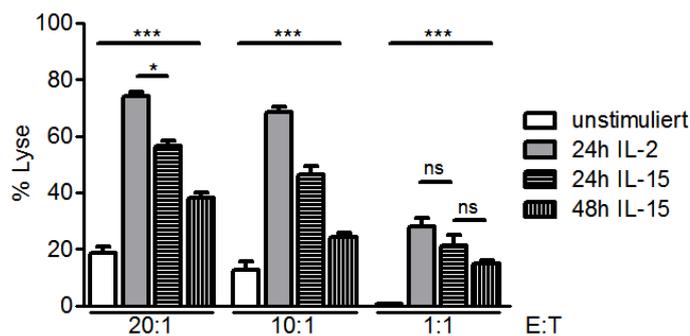


Abbildung 10: Veränderung des *in vitro* Lyseverhaltens nach *in vitro* Zytokin-Stimulation

Nach 24h oder 48h *in vitro* Vorstimulation von C57BL/6 NK-Zellen mit 5.000 U/ml IL-2 oder 25 ng/ml IL-15 erfolgte eine 24-stündige Inkubation mit syngenem B16F10 Melanom Tumorzellen in unterschiedlichen, angegebenen E:T-Ratios. Die Quantifizierungen erfolgten anhand von Zellzytotoxizitätsassays. Die Abbildung legt gepoolte Daten aus 11 Experimenten (n=11) dar. Die Signifikanz wurde mit one-way ANOVA-Test und Dunnetts-Post-Test berechnet (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001). Die Signifikanz gilt für die gesamte E:T Gruppe jeweils zueinander, solange nicht anders angegeben.

In Abbildung 10 ist das *in vitro* Lyseverhalten von *in vitro* Zytokin-stimulierten NK-Zellen dargestellt. Die Daten aus 11 Zellzytotoxizitätsassays ergaben in der Gesamtheit eine einheitliche Darstellung des Lysevermögens von NK-Zellen nach *in vitro* Zytokin-Stimulation.

Die geringste Effektivität zeigten frisch isolierte, unstimulierte NK-Zellen. Diese Zellen waren zum Einsatzzeitpunkt zwar viabel, verloren jedoch über die 24-stündige Dauer der Inkubation ihre Viabilität. Bemerkenswert ist aber, dass auch diese frischen NK-Zellen ohne vorherige Stimulation oder Aktivierung circa 20% der eingesetzten Tumorzellen eliminierten. Dies veranschaulicht die erstaunliche Potenz, die in NK-Zellen steckt.

Eine E:T-Ratio von 20 zu 1 wurde aus Vorexperimenten (nicht gezeigte Daten) der Arbeitsgruppe als maximal angesehen.

Die höchste Zytotoxizität wiesen die mit niedriger Dosis IL-2 (5.000 U/ml) stimulierten NK-Zellen auf. Ohne vorheriges Priming auf diese Tumorzellart lysierten sie signifikant bis zu 80% der eingesetzten Tumorzellen. Das Überleben der NK-Zellen war in diesem Milieu am höchsten und unterstützte deutlich die hohe Zytotoxizität. Nach 24 Stunden Inkubation waren durchschnittlich noch signifikant mehr IL-2 stimulierte NK-Zellen lebendig als nach IL-15 Stimulation (siehe Abbildung 7A und Abbildung 7B). Eine Lyserate von 80% veranschaulicht das Potential, das IL-2 stimulierte NK-Zellen bei einem adoptiven Transfer zukünftig auch in der klinischen Anti-Tumor-Therapie erreichen könnten.

Nach 24 Stunden Stimulation mit 25 ng/ml IL-15 erreichten die NK-Zellen noch eine Lyse der Tumorzellen von 60%. Dies ist beachtlich, da nach 24 Stunden IL-15 Stimulation signifikant weniger NK-Zellen lebendig und funktionstüchtig waren. Bei einer um 50% reduzierten Zellzahl (siehe Abbildung 7B) wurde hier dennoch eine Tumorzellelimination von 60% erreicht. IL-15 zeigte ebenfalls einen gesteigerten zytotoxischen Effekt auf NK-Zellen.

5.4.2 Veränderung der *in vitro* Lysekapazität von NK-Zellen nach *in vivo* Zytokin-Stimulation

Um den Effekt der Zytokin-Stimulation auch im komplexen Gesamtbild eines Säugetier-Organismus beurteilen zu können, wurden C57BL/6 Mäuse vier Tage lang mit jeweils 250ng IL-15 (Interventionsgruppe) oder dem gleichen Volumen an Phosphat buffered Saline (PBS) in der Kontrollgruppe behandelt. Somit wurden die Versuchstiere identischem Stress (physischer und psychischer) der i.p. Injektion ausgesetzt. Am fünften Tag wurden die Mäuse euthanasiert und deren Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Lunge zur Analyse der darin enthaltenen NK-Zellen entnommen. In Abbildung 11 sind die phänotypischen und funktionalen Veränderungen der NK-Zellen der Milz aufgetragen. Diagramm A zeigt die Veränderungen in der Verteilung der murinen Subpopulationen, Diagramm B zeigt die Lysekapazität der NK-Zellen bezüglich unterschiedlicher E:T-Ratios.

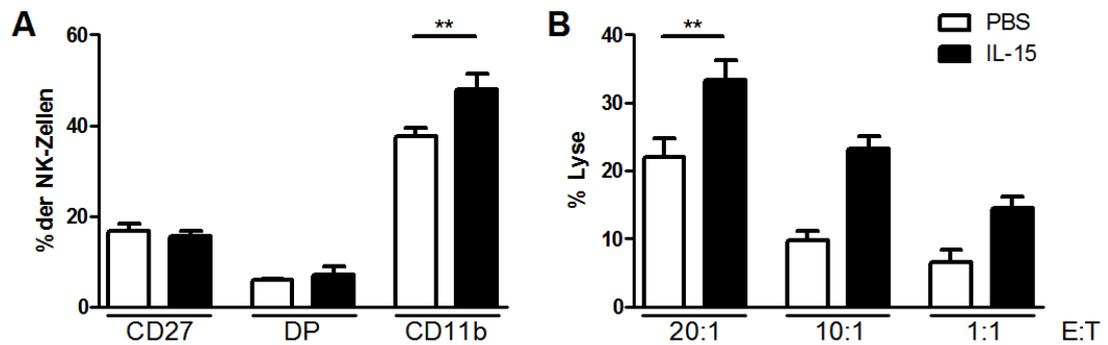


Abbildung 11: Veränderungen der Subpopulationsverteilung und des Lyseverhaltens von NK-Zellen nach *in vivo* IL-15 Stimulation

C57BL/6 Mäusen wurden *in vivo* über vier Tage täglich 250 ng IL-15/Maus/Tag oder PBS i.p. injiziert. Am Tag 5 erfolgte die Isolierung der NK-Zellen aus der Milz und die anschließende MACS Aufreinigung. Es wurden durchflusszytometrisch die NK-Zell-Subpopulationen der Milz gefärbt (A) und mittels Zellzytotoxizitätsassay die *in vitro* Lysekapazität der Milz NK-Zellen (B) untersucht. Die FACS Analyse erfolgte mit Antikörpern gegen NK1.1, CD3, CD27 und CD11b (siehe Kapitel 4.2.11). Die Abbildungen zeigen die Daten eines Experiments von insgesamt 2 Experimenten (n=1). Die Signifikanz wurde mit one-way ANOVA-Test und Dunnett's-Post-Test berechnet (**=p<0.01).

Die CD27⁺ und DP Subpopulationen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen nach *in vivo* IL-15 Stimulation auf. In der muren CD11b⁻ Subpopulation war eine signifikante Zunahme um 10,1% nach Stimulation mit IL-15 zu erkennen. IL-15 scheint somit die Reifung von NK-Zellen hin zu CD11b⁺-Zellen auch *in vivo* anzuregen. Dies spiegelt sich auch im Lyseverhalten der *in vivo* IL-15 stimulierten NK-Zellen wieder. Abbildung 11B zeigt eine signifikant gesteigerte Tumorzell-Elimination nach IL-15 Stimulation der NK-Zellen. In der Gruppe mit der E:T-Ratio von 20:1 zeigten die magnetisch aufgereinigten C57BL/6 NK-Zellen einen signifikanten Unterschied von 11,4% in ihrer Lysekapazität auf. Die Reifung der NK-Zellen hin zu mehr Zellen der CD11b⁺ Subpopulation bewirkte analog auch die Steigerung ihrer Zytotoxizität.

5.5 Etablierung der Methode der Biolumineszenz Bildgebung

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die Methode der *in vivo* Biolumineszenz Bildgebung in der Arbeitsgruppe etabliert (Bioluminescence Imaging, BLI, siehe Kapitel 4.2.11) und hierfür ein zuverlässiges Protokoll erstellt.

In diesen Experimenten wurde ein für Balb/c Mäuse syngenes diffuses großzelliges B-Zell-Lymphom (BCL-1-Luc⁺gfp⁺) verwendet, welches das Enzym Luziferase (Luc⁺) und green fluorescent protein (gfp⁺) stabil exprimiert

und als Prädilektionsort in der Milz auftritt (siehe auch Kapitel 4.1.4, 4.2.12) [164].

Passagierung

Die verwendeten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen waren zwar syngen in ihrer Herkunft, das Wachstum gestaltete sich allerdings in dem verwendeten Balb/c Mausstamm (siehe Kapitel 4.1.5) langsam und schwierig. Erst nach mehreren Passagen, die mehrere Monate dauerten, stellte sich ein stabiles Wachstum ein. Diese Passagen der Zellkultur erfolgten dabei *in vivo*, da eine *in vitro* Zellkultur der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen technisch nicht möglich war (siehe Kapitel 4.2.1, 4.2.12).

In der ersten Passage mit 20.000 injizierten Zellen pro Maus zeigte sich an Tag 59 bei einer von elf Mäusen ein Wachstum des Lymphoms. Der Prädilektionsort in der Milz konnte bestätigt werden. Im Verlauf des Versuchs bis zum Ende an Tag 106 zeigte sich ein Tumorwachstum in vier weiteren Mäusen.

In der Passage zwei wurde die eingesetzte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellzahl in einem Teil der Mäuse erhöht. Es zeigte sich bei einer erhöhten injizierten Anzahl von $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Maus schon nach 22 Tagen ein erstes Tumorwachstum in der Milz (1 von 12). Nach 29 Tagen zeigte sich auch ein Wachstum bei 6 weiteren von 12 Mäusen (7 von 12). Im Vergleich zur Passage 1 wuchs das Lymphom wesentlich früher bei 7 von 12 Mäusen in der Milz, auch bei jenen Mäusen, die nur die ursprüngliche Zellzahl von $2 \cdot 10^4$ Zellen erhalten hatten.

In Passage 7 und 8 stellte sich ein homogenes Wachstum des Lymphoms ein. Neben der Milz als Zielort war auch in Einzelfällen ein Wachstum im Bereich des Thymus der noch jungen Mäuse zu beobachten. Abbildung 12 zeigt das Wachstum des BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphoms in der Milz. Der Verlauf eines repräsentativen Exemplars von unbehandelten Mäusen ist dargestellt. Eine Erhöhung der injizierten Zellzahl ($5 \cdot 10^4$ gegenüber $2 \cdot 10^4$) ergab in Passage 7 nur noch einen minimalen Unterschied hinsichtlich des Tumorwachstums. In Passage 8 (Abbildung 12C) erfolgte nach Tag 14 keine spätere Bildgebung mehr. Die eingesetzte Farbskala ist linear und für alle Bilder einheitlich in der Einheit Counts.

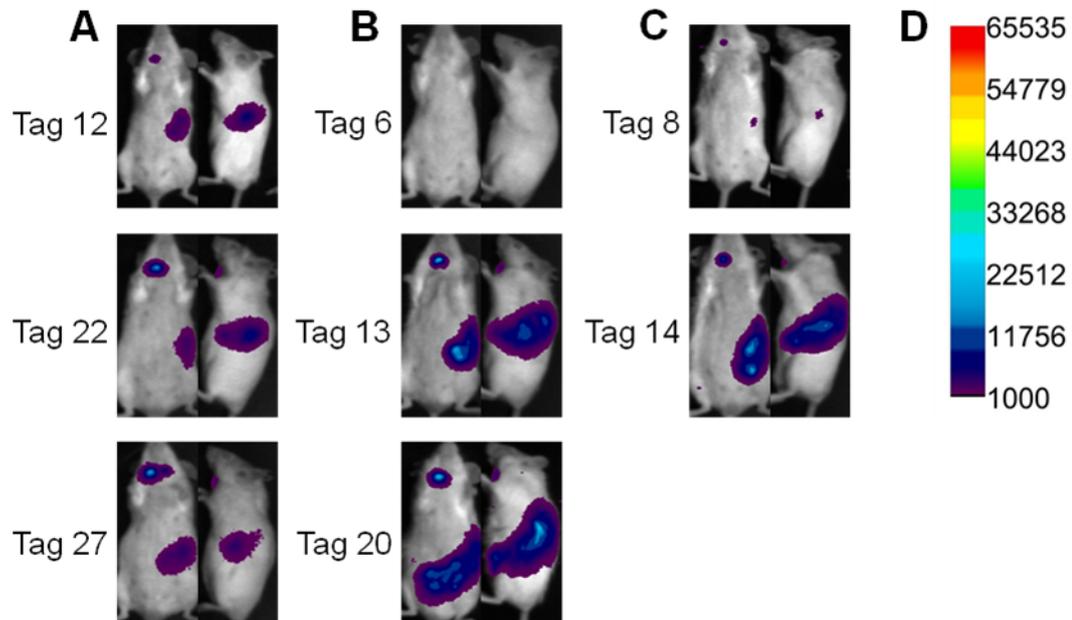


Abbildung 12: BCL-1-Luc⁺gfp⁺ Wachstum nach Tumorzellselektion

Allen Versuchstieren wurden in unterschiedlichen Experimenten frisch isolierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen aus unterschiedlichen Passagen und in unterschiedlicher Zellzahl injiziert. Dabei wurde bei einer Maus aus Passage 6 2*10⁴ Zellen pro Maus (**A**), bei einer Maus aus Passage 7 2*10⁴ Zellen pro Maus (**B**) und bei einer Maus aus Passage 8 5*10⁴ Zellen pro Maus (**C**) eingesetzt. Im zeitlichen Verlauf der Versuche wurden mehrere BLI-Messungen durchgeführt. Die Auswertung erfolgte anhand einer (**D**) einheitlichen linearen Farbskala mit der Einheit Counts.

5.6 Verwendungsmöglichkeit der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen

Nachdem ein stabiles Wachstum des Lymphoms beobachtet wurde, folgte eine Evaluation der Beständigkeit der Tumorzellen nach Kryokonservierung. Nach Vorexperimenten und Viabilitätsmessungen wurde die eingesetzte Zellzahl der kryokonservierten Zellen verdoppelt (nicht gezeigte Daten). In Abbildung 13A ist exemplarisch eine Maus nach der Injektion von 0,5*10⁵ frisch isolierten und sortierten Zellen zu sehen. Am Tag 8 nach Injektion ist bereits ein Wachstum im Bereich der Milz zu erkennen. Durch die Beschränkung der Farbskala auf den minimalen Wert 1000 stellt sich der Bereich relativ klein dar. In Abbildung 13B ist eine Maus nach der Injektion von 1*10⁵ aufgetauten Zellen der Passage 7 zu sehen. Hier ist bereits ein eindeutiges Wachstum innerhalb der Milz erkennbar. Bei abgeschaltetem Anti-Blooming können teilweise auch andere Bildbereiche fälschlich illuminiert werden, was vom zeitgleich gemessenen Partnertier ausgeht (siehe Kapitel 4.2.12).

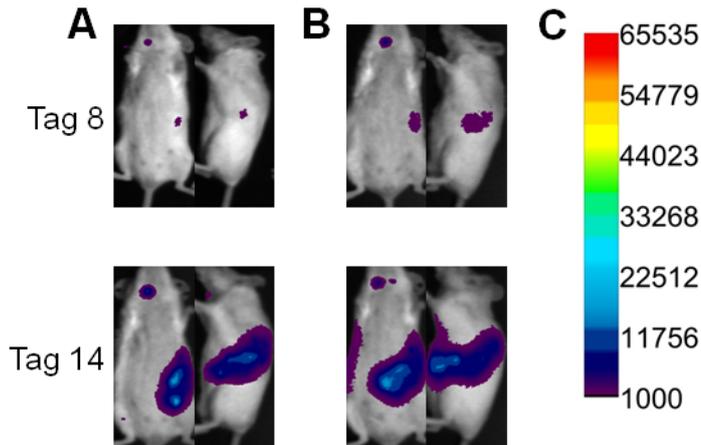


Abbildung 13: Wachstum von frisch isolierten oder kryokonservierten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen

Allen Versuchstieren wurden BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen aus unterschiedlichen Passagen und in unterschiedlicher Zellzahl injiziert. Dabei wurden einer Versuchsgruppe $0,5 \cdot 10^5$ frisch isolierte und sortierte Zellen der achten Passage pro Maus (A) und einer $1 \cdot 10^5$ kryokonservierte Zellen der siebten Passage pro Maus (B) appliziert. An Tag 8 und Tag 14 wurde eine Biolumineszenz Bildgebung durchgeführt. Die Darstellung folgt anhand einer einheitlichen linearen Farbskala mit der Einheit Counts (D).

Durch die Verwendung aufgetauter Zellen wurden komplexere und aufwendigere Experimente ermöglicht. Zunächst wurde die Zytotoxizität der NK-Zellen in Ko-Kultur mit BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen geprüft. C57BL/6 NK-Zellen sind in Richtung BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen (aus Balb/c Mäusen) allogon (siehe Tabelle 6). Dahingehend wurde analysiert, ob NK-Zellen die BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen *in vitro* eliminieren können.

Dafür wurden frisch isolierte und sortierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen mit *in vitro* Zytokin-stimulierten NK-Zellen *in vitro* inkubiert. Um die Tumorzellen eindeutig und besser identifizieren zu können, wurde ein zusätzlich zum gfp⁺ ein PKH-67 Staining durchgeführt (siehe Kapitel 4.1.4, 4.2.9). Dabei bindet der Farbstoff, welcher ebenfalls im grünen Farbspektrum leuchtet, an die Membran der Tumorzellen und verstärkt so das im grünen Farbspektrum liegende Signal. Lebendige Zellen mit einer intakten Membran lassen sich so besser zuordnen. Die dafür verwendete Gating-Strategie ist in Abbildung 14A dargestellt.

Nach der Auswahl der Größe und Granularität der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen folgte die Auswahl anhand des grünen FITC-Kanals mit Überlagerung von gfp⁺ und PKH-67. Im jeweils rechten Dichteplot-Diagramm der Abbildung 14 wird die Population nach AnxV und 7AAD aufgeschlüsselt. Es ist dabei zu sehen, dass frische Tumorzellen nach den Behandlungsschritten im Labor

noch zu circa 86% lebendig sind, während 13% als avital und somit als apoptotisch oder nekrotisch einzuordnen sind. In Abbildung 14B ist das Überleben der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen im Verlauf zu sehen. Sie wurden über unterschiedliche Zeitdauern mit IL-2 stimulierten (5.000 U/ml IL-2, 18 Stunden) allogenen C57BL/6 NK-Zellen inkubiert. Nach 30 Minuten waren nur noch circa 56% der Tumorzellen lebendig. Der Wert sinkt weiter mit zunehmender Dauer der Inkubation. Verglichen dazu ist in Abbildung 14C der Verlauf nach Inkubation mit IL-15 stimulierten (25 ng/ml IL-15, 18 Stunden) NK-Zellen zu sehen.

Im jeweils linken Diagramm der Abbildung 14 zeigt sich, dass noch circa 64% der Tumorzellen lebendig sind. Die IL-2 aktivierten NK-Zellen waren effektiver in ihrer zytotoxischen Funktion gegenüber BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen. Im Verlauf der Inkubation nahm auch die Lyserate der IL-15 stimulierten NK-Zellen zu, diese war stets circa 10% niedriger als bei den IL-2 aktivierten NK-Zellen. In Abbildung 14D ist die statistische Analyse zu sehen. Nach sechs Stunden lässt sich folgende Tendenz ablesen: IL-2 aktivierte NK-Zellen scheinen circa 10-15% mehr BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen zu lysieren als IL-15 aktivierte NK-Zellen. Im zeitlichen Verlauf wird sichtbar, dass dieser Effekt bereits nach 30 Minuten zu registrieren ist.

Diese Beobachtung unterstreicht die wichtige Rolle, welche NK-Zellen innerhalb des früh einsetzenden angeborenen Abwehrmechanismus haben. In der Gatingstrategie erfolgt nach Auswahl der Gesamtmorphologie eine Selektion von FITC⁺-Tumorzellen. Das gfp⁺ wird maßgeblich nur von lebendigen Zellen getragen. Zur Identifikation von Zellen, welche kurz vor der Apoptose stehen, diente die zusätzliche Überfärbung mit PKH-67. Abgestorbene Zellen fallen somit zum Teil in die FITC-positive Population. Dieser Gatingsschritt ist notwendig, um in der Analyse nur die BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Tumorzellen zu berücksichtigen.

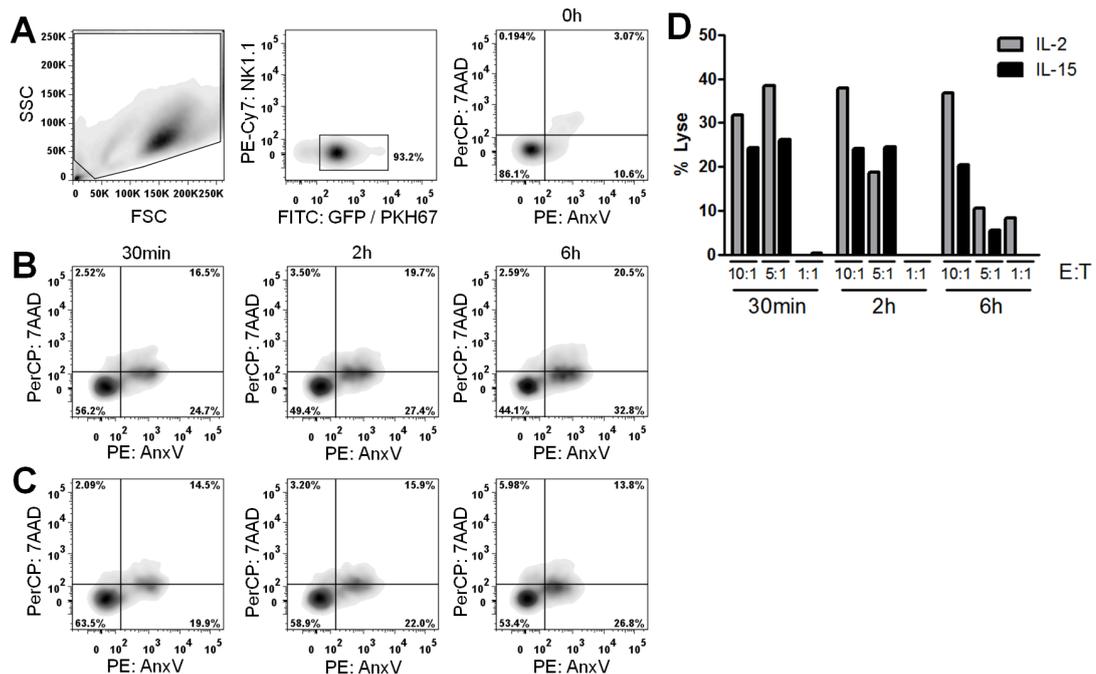


Abbildung 14: Zytotoxizität von NK-Zellen gegen BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen

Frisch isolierte und sortierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen wurden in unterschiedlicher E:T-Ratio mit NK-Zellen *in vitro* inkubiert. Die durchflusszytometrischen Messungen wurden anhand derselben Gatingstrategie (A) ausgewertet. Zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgten die Messungen, sofort nach Inkubationsbeginn (0h), nach 30 min, nach zwei Stunden und nach sechs Stunden, wobei direkt nach Beginn die Viabilität der eingesetzten Tumorzellen und NK-Zellen überprüft wurde. Die NK-Zellen wurden vorab 18h mit 5.000 U/ml IL-2 (B) oder 25 ng/ml IL-15 (C) stimuliert. Die Dichteplots zeigen den zeitlichen Verlauf bei einer E:T-Ratio von 10:1. Die statistische Darstellung (D) zeigt die Daten von insgesamt 2 Färbungen (n=2). Die Signifikanz wurde mit two-way ANOVA und Dunnett-Post-Test berechnet.

Nach 30 Minuten Inkubation war bereits eine gesteigerte Zytolyse der IL-2 stimulierten NK-Zellen (Abbildung 14B) gegenüber IL-15 stimulierten NK-Zellen (Abbildung 14C) zu erkennen. Dies lässt sich besonders gut am linken unteren Quadranten ablesen, welcher die vitalen Tumorzellen zeigt. 56,2 % der BCL-1-Luc⁺gfp⁺ waren nach 30 Minuten Ko-Kultur mit IL-2 stimulierten NK-Zellen lebendig, im Vergleich zu 63,5 % nach 30 Minuten Inkubation mit IL-15 stimulierten NK-Zellen. Bereits sehr zeitig nach dem Kontakt mit der Tumorzelle beginnt die NK-Zelle ihre zytotoxische Funktion auszuüben. Nach 2 Stunden, beziehungsweise 6 Stunden in Ko-Kultur nahm die Differenz noch leicht zu. Nach 6 Stunden waren fast 10% mehr Tumorzellen von IL-2 stimulierten NK-Zellen lysiert, als von IL-15 stimulierten NK-Zellen.

Es wurde stets eine Probe mit unbehandelten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Tumorzellen mitgeführt und die Viabilität zu den unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen (nicht gezeigte Daten). In der Messung konnte dabei nur eine leichte Abnahme der prozentualen Viabilität bemerkt werden, da sich nach 6

Stunden im Medium immer noch mehr als 75% der unbehandelten Lymphom-Zellen lebendig zeigten.

Auch eine Veränderung im Shift der Populationen Richtung Apoptose, dargestellt durch zunehmende Signalintensität für AnxV, ist zwischen den zwei Versuchsgruppen nicht sichtbar. In den Ko-Kulturen der IL-2 stimulierten sowie der IL-15 stimulierten NK-Zellen waren die Bewegungen der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen in Richtung Apoptose (AnxV⁺7AAD⁻), beziehungsweise Nekrose (AnxV⁺7AAD⁺), gleich und prozentual vergleichbar.

Für alle drei Zeitpunkte ist ein vergleichbarer Prozentsatz der Zellelimination in Abbildung 14D gezeigt. In der statistischen Berechnung sind zwei Experimente einbezogen worden. Die Ergebnisse sind heterogen und zeigen keine eindeutige Tendenz auf. Nach 30 Minuten war bereits ein großer Teil des Zelleliminationsprozesses abgelaufen. Nach IL-2 Stimulation wurden 30-40% der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen lysiert. IL-15 hatte einen weniger zytotoxizitätsstimulierenden Aspekt auf die NK-Zellen. Mit einer E:T-Ratio von 1:1 trat keine nachweisbare Zelllyse auf. Die Ergebnisse sind vergleichbar zur Zellelimination von B16F10 Melanomzellen (siehe Abbildung 10). Die Rate an lysierten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen war jedoch deutlich niedriger. Bei B16F10 Zellen lag die durch Zytokin-stimulierte NK-Zellen vermittelte Zellelimination nach Stimulation mit IL-2 bei circa 60-80%.

Nach 2-stündiger Inkubation waren die Prozentsätze der Lyse der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen vergleichbar zur Messung nach 30 Minuten. Nach IL-2 Stimulation wurde weiterhin eine Rate von 30-40 % der BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen bei einer E:T-Ratio von 10:1 eliminiert. Mit IL-15 stimulierten Zellen wurde eine vergleichbare Lyse von 20-30 % vermittelt. Es fand sich keine wesentliche Zunahme oder Abnahme im Lyseverhalten. In einer E:T-Ratio von 5:1 wurde mit IL-2 stimulierten Zellen eine deutlich geringere Rate erreicht. Die IL-15 stimulierte NK-Zellen lysierten dagegen einen vergleichbaren Anteil an BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen von 20-30 %. Bei einer E:T-Ratio von 1:1 war nach 2 Stunden kein zellzytotoxischer Effekt erkennbar.

Im weiteren Verlauf der Inkubation zeigte sich das Bild der Lyse homogen. In der FACS Messung nach 6h zeigten sich die IL-2 stimulierten NK-Zellen in einer E:T-Ratio von 10:1 klar als sehr effektiv. Dagegen trat nach IL-15

Stimulation in einer E:T-Ratio von 1:1 keine nennenswerte Zytolyse auf. Bemerkenswerterweise waren in dieser niedrigen E:T-Ratio von 1:1 die IL-2 stimulierten NK-Zellen nach 6h Ko-Inkubation noch wirksam. Die statistische Berechnung erfolgte mit einer zweifaktoriellen (two-way) Varianzanalyse (ANOVA) und Dunnets-Post-Test. Diese berücksichtigt die Zeit, als abhängige Variable im Verlauf.

In beschriebenen Umfang sind NK-Zellen in der Lage, die Zellen des BCL-1-Luc⁺gfp⁺ B-Zell-Lymphoms *in vitro* zu lysieren. Hieraufhin folgte eine *in vivo* Evaluation im Tiermodell. Dafür wurden $0,2 \times 10^5$ frisch isolierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen in Balb/c Mäuse injiziert und der Verlauf protokolliert (Gruppe A). Ein Teil der Versuchstiere erhielt zusätzlich einen adoptiven Transfer von 1×10^6 allogenen IL-2 stimulierten NK-Zellen (Gruppe B) oder eine IL-2 Applikation zweimal täglich mit 100.000 Units pro Maus (Gruppe C). Eine Bestrahlung wurde nicht durchgeführt. Es wurde an Tag 12, 22 und 27 eine BLI-Messung vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt. An Tag 12 konnte in fast allen Mäusen ein Signal nachgewiesen werden. In Maus 1 und 3 der Gruppe C lag das Signal in der Fläche noch unter der unteren Grenze von 1000 Counts. Alle Versuchstiere waren bis Tag 22 erwartungsgemäß klinisch stabil. Im Verlauf ab Tag 22 zeigte sich über alle Gruppen hinweg ein heterogener Verlauf.

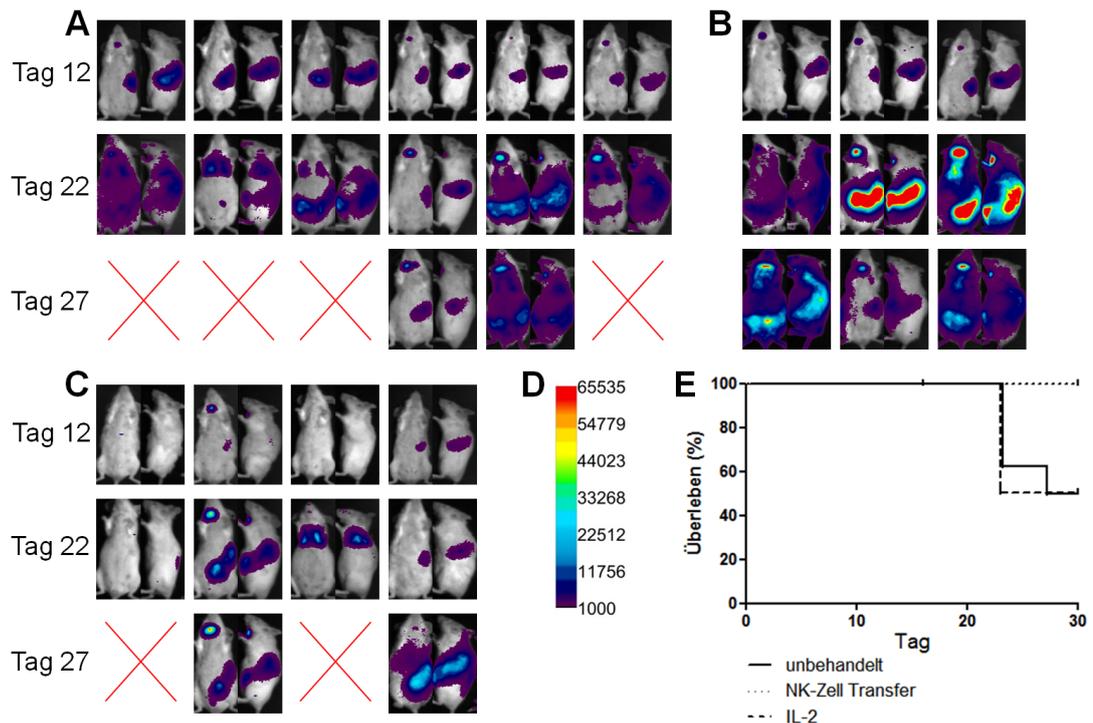


Abbildung 15: adoptiver Transfer Zytokin-Stimulierter allogener NK-Zellen

Allen Versuchstieren wurden $0,2 \cdot 10^5$ frisch sortierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 5 injiziert. Dabei wurde keine Bestrahlung vorgenommen. Eine Kontrollgruppe (Gruppe A) (A) wurde ohne weitere Intervention überwacht, eine Gruppe erhielt zusätzlich an Tag 2 einen Transfer von 6 Stunden mit 5.000 U/ml IL-2 stimulierten $1 \cdot 10^6$ allogenen C57BL/6 NK-Zellen (Gruppe B) (B) und eine weitere Gruppe die ersten 4 Tage lang zweimal täglich eine Behandlung mit 100.000 Units IL-2 pro Maus (Gruppe C) (C). Der Zustand, der Gewichtsverlauf und das Überleben der Tiere (E) wurden dabei regelmäßig protokolliert. An Tag 12, 22 und 27 erfolgte eine Biolumineszenz Bildgebung. Die Auswertung wurde anhand einer einheitlichen Farbskala (D) vorgenommen.

In der Kontrollgruppe A wuchs das Lymphom in der Milz und teilweise im Thymus oder der Lunge. Ein Wachstum in der Milz war in Gruppe B sichtbar. Ab Tag 22 konnte ein manifester Progress des Lymphoms in Maus 2 und Maus 3 der Gruppe B festgestellt werden. Die Signalintensität nahm bis in den maximalen Bereich zu, mit zusätzlichem Blooming in benachbarte Areale. Maus 1 der Gruppe B zeigte einen unauffälligen, mit der unbehandelten Gruppe A vergleichbaren Verlauf bis Tag 22. Die Interleukin-behandelte Gruppe C stellte sich ebenfalls heterogen dar. An Tag 22 zeigten Maus 1 und 3 ein untypisches Wachstumsmuster, bei Maus 3 kam es zum Tumorwachstum in der Lunge.

Die Belichtungszeit und Luziferin Dosis war zu allen Zeitpunkten identisch mit der Kontrollgruppe A. Im weiteren Verlauf des Experiments kam es unerwartet zum Tod einiger Versuchstiere. In Gruppe A verstarben 4 von 6 Versuchstieren an Schwäche aufgrund der Narkose, Tumorprogression oder Kannibalismus.

Zur geplanten BLI-Messung an Tag 27 waren nur noch 7 von 13 der dargestellten Tiere am Leben. Insgesamt umfasste der Versuch 16 Versuchstiere. Drei Mäuse der Kontrollgruppe A sind nicht dargestellt. Auffällig war, dass ein Signal in Maus 2 und 3 der Gruppe B deutlich nachließ. Die überlebenden Mäuse der Gruppe A und C zeigten ein stabiles Wachstumsverhalten.

Insgesamt zeigte sich die Signalintensität an Tag 27 etwas schwächer. In der Beobachtung wurde eine deutliche Abnahme der Signalintensität in der Versuchsgruppe nach NK-Zell-Transfer gemessen. Aufgrund der hohen Mortalität und der weiteren Verschlechterung des Allgemeinzustands in der Kontrollgruppe A wurde der Versuch an Tag 30 abgebrochen. Das dargestellte Kaplan-Meier-Diagramm (Abbildung 15E) zeigt das Überleben der Versuchstiere. In der mit allogenen NK-Zellen behandelten Gruppe B ließ sich das beste Gesamtüberleben erkennen.

Um die Ergebnisse zu überprüfen, wurde ein zweites umfangreiches Experiment mit einem adoptiven Transfer von allogenen NK-Zellen durchgeführt. Dabei wurden die Versuchstiere ebenfalls nicht bestrahlt. Der Aufbau glich dem Versuch aus Abbildung 15. Allen Versuchstieren wurden $0,2 \cdot 10^5$ aus frischen Splenozyten isolierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen injiziert. Ein Teil wurde ohne weitere Maßnahmen überwacht (Gruppe A). Zusätzlich erfolgte in der Interventionsgruppe am zweiten Tag ein Transfer von $1 \cdot 10^6$ allogenen NK-Zellen aus der C57BL/6 Maus (Gruppe B). Diese waren zuvor 6 Stunden mit IL-2 (5.000 U/ml) stimuliert worden. An Tag 6, 13 und 20 wurde eine Biolumineszenz Bildgebung durchgeführt. Kein Wachstum war an Tag 6 zu erkennen. Im weiteren Verlauf konnte an Tag 13 ein homogenes Signal in beiden Gruppen objektiviert werden. Zur Messung an Tag 20 waren alle Versuchstiere vital. Die Signalintensität unterschied sich zwischen den Gruppen nicht deutlich.

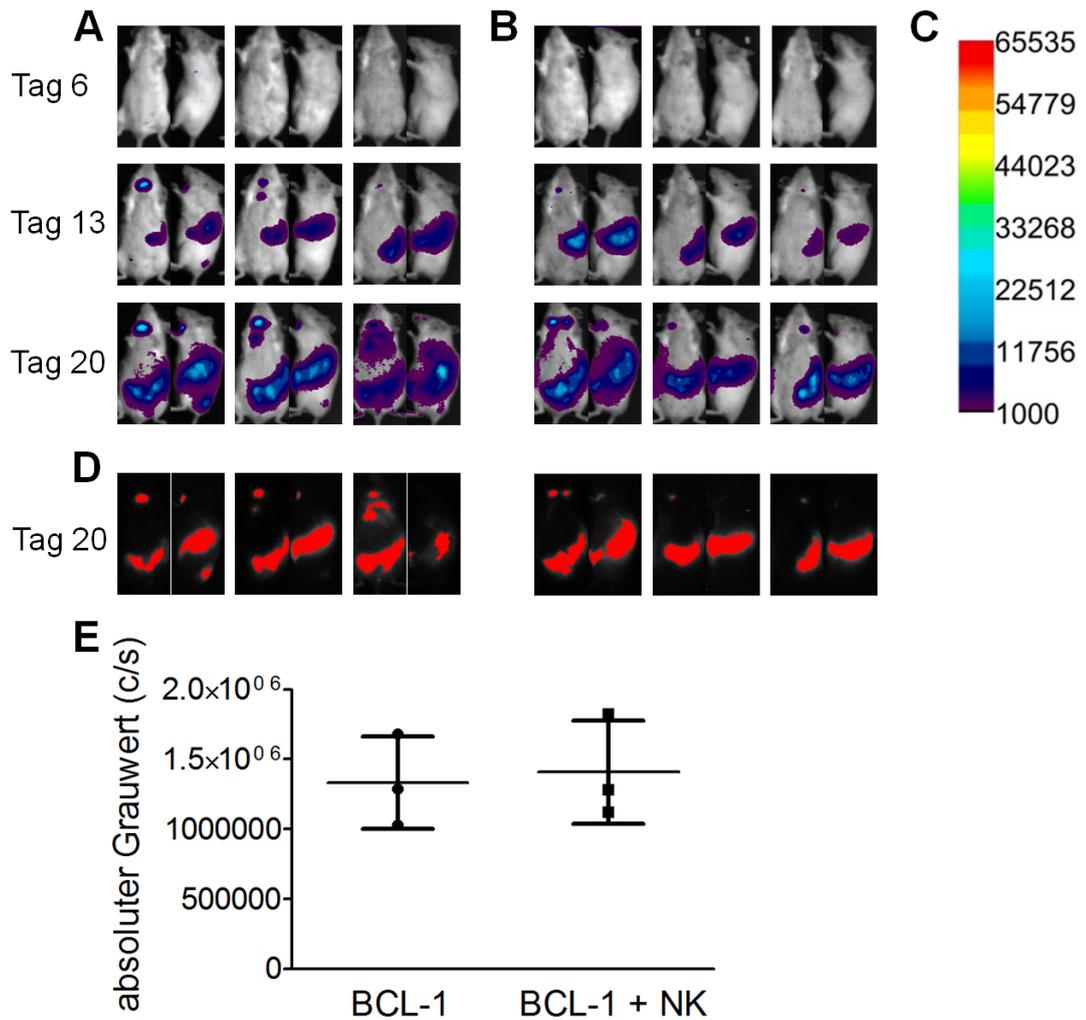


Abbildung 16: adoptiver NK-Zell-Transfer

Allen Versuchstieren wurden $0,2 \cdot 10^5$ frisch sortierte BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 7 injiziert. Dabei wurde keine Bestrahlung vorgenommen. Eine Kontrollgruppe (Gruppe A, BCL-1) (**A**) wurde ohne weitere Intervention überwacht, die Interventionsgruppe erhielt zusätzlich an Tag 2 einen Transfer von $1 \cdot 10^6$ allogenen C57BL/6 NK-Zellen, die zuvor mit IL-2 stimuliert worden waren (Gruppe B, BCL-1 + NK) (**B**). Eine Quantifizierung des Biolumineszenzbilds an Tag 20 (**E**) wurde anhand des erstellten Makros vorgenommen und der entsprechende Bildteil automatisch selektiert (**D**). Die Auswertung erfolgte anhand einer einheitlichen Farbskala (**C**).

In der Betrachtung der Überlagerungsbilder fällt ein homogenes Wachstum des Lymphoms in Gruppe A und B auf. In Abbildung 16E wurde das Quantifizierungsmodul des programmierten Makros benutzt, um Versuchs- und Kontrollgruppe an Tag 20 automatisiert zu vergleichen (siehe Kapitel 4.2.12). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Biolumineszenzintensität festgestellt werden. Zur Veranschaulichung ist der automatisch gemessene Bereich der Dunkelfeldbilder der Biolumineszenz Bildgebung in Abbildung 15D zusätzlich mit dargestellt. Da die

Abbruchkriterien des Versuchs von einer Mehrzahl der Versuchstiere erreicht wurden, war eine Messung zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr möglich.

5.7 Graft-versus-Lymphom Effekt und Graft-versus-Host Erkrankung

Im dritten Teil der Arbeit wurde das Verhalten immunologischer Zellen nach hämatopoetischer allogener Stammzelltransplantation untersucht. Der rein adoptive Transfer von Zytokin-stimulierten allogenen C57BL/6 NK-Zellen erzielte in der kurzen Beobachtungszeit keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Progression des Lymphoms. Ein anderer Ansatz in der Lymphom-Therapie ist der Einsatz von NK-Zellen im Zusammenhang mit einer allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation.

Hierfür wurde zusammen mit Dr. rer. nat. Irena Kröger und Dr. rer. nat. Kathrin Meinhardt unserer Arbeitsgruppe ein Versuchsprotokoll etabliert, um die Ergebnisse in ein GvL- und GvHD-Maus-Modell einzugliedern. Der Ablauf der Versuche ist in Kapitel 4.2.13 beschrieben.

Zunächst wurde das Ansprechen, Überleben und das Wachstum des BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphoms in der allogenen Knochenmarktransplantation der Maus überprüft. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt. 14 Versuchstiere erhielten an Tag 0 eine subletale Bestrahlung mit 8,5 Gy und anschließend an Tag 1 eine Knochenmarktransplantation mit $5 \cdot 10^6$ T-Zell-freien Knochenmarkzellen. Die Kontrollgruppe (KM) wurde ohne weitere Intervention überwacht. Eine Versuchsgruppe (KM+T-Zellen) erhielt zusätzlich an Tag 2 $1 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 exprimierende Pan-T-Zellen. Zudem erfolgte an Tag 1 zusätzlich bei einem Teil der Tiere die Gabe von $0,2 \cdot 10^6$ aufgetauten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen der Passage 7 (KM+BCL-1; KM+BCL-1+T-Zellen).

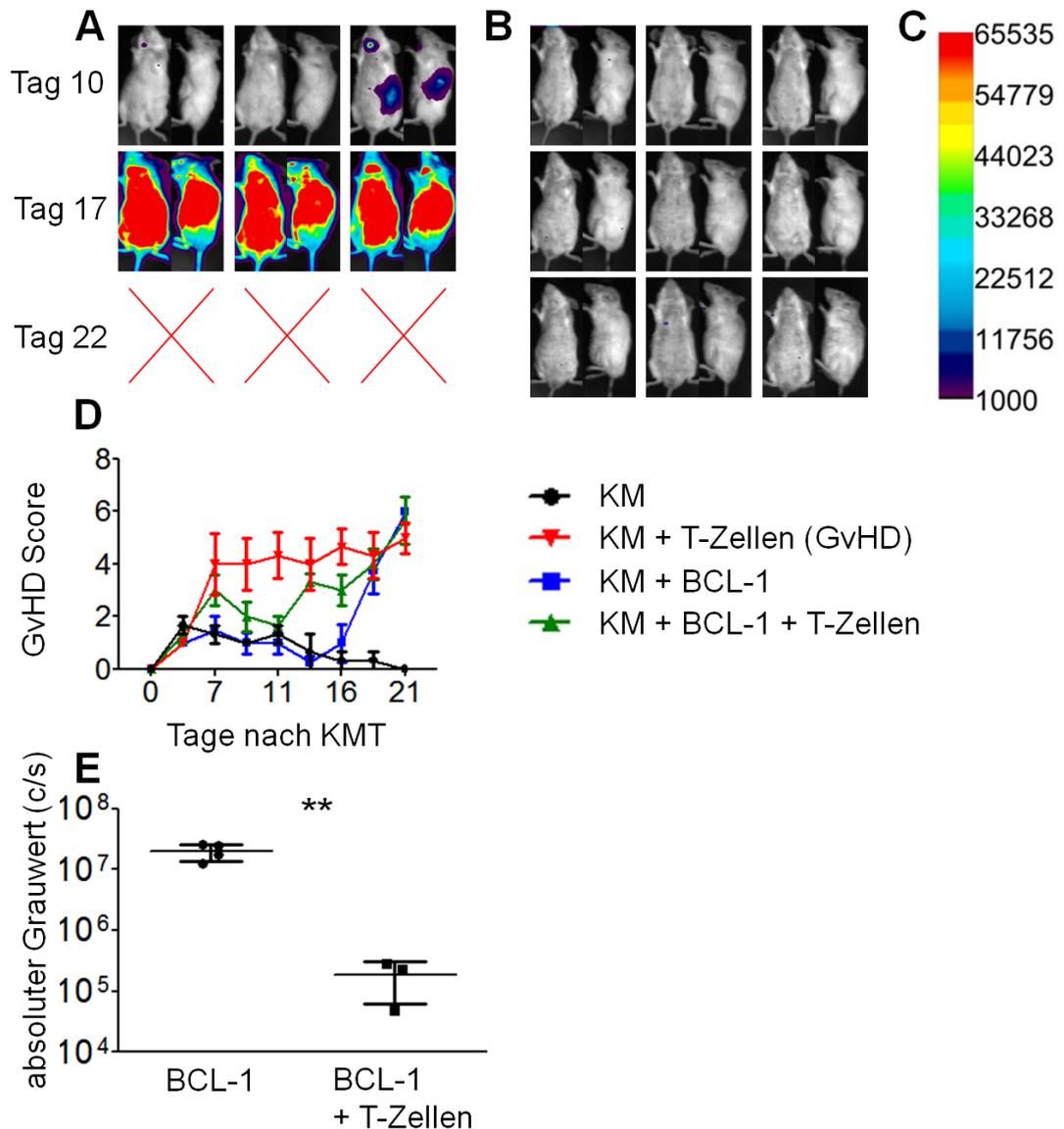


Abbildung 17: BCL-1-Luc⁺gfp⁺ und allogene Knochenmarktransplantation (1)

Alle Versuchstiere erhielten an Tag 0 eine Bestrahlung mit 8,5 Gy und anschließend an Tag 1 eine Knochenmarktransplantation von $5 \cdot 10^6$ T-Zell-freien Knochenmarkszellen. Die Kontrollgruppe (KM) wurde ohne weitere Intervention überwacht. Eine Versuchsgruppe erhielt am zweiten Tag $1 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 tragende Pan-T-Zellen (KM+T-Zellen (GvHD)), einer anderen Versuchsgruppe wurden an Tag 1 $0,2 \cdot 10^6$ aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 7 injiziert (KM+BCL-1) und eine Biolumineszenz Bildgebung an Tag 10 und 17 vorgenommen (A). Eine weitere Versuchsgruppe erhielt an Tag 1 $0,2 \cdot 10^6$ BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen und an Tag 2 $1 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 tragende Pan-T-Zellen (KM+BCL-1+T-Zellen). Die Biolumineszenz Bildgebung wurde an Tag 10, 17 und 22 vorgenommen (B). Eine Quantifizierung der Biolumineszenzbilder an Tag 12 (E) wurde anhand des erstellten Makros vorgenommen und logarithmisch aufgetragen. Die Darstellung unter, B und E zeigt die Daten von insgesamt 7 Versuchstieren (n=7), in Abbildung 17D von 14 Versuchstieren (n=14). Die Signifikanz wurde mit Mann-Whitney-U-Test berechnet (*=p<0.05, **=p<0.01, ***=p<0.001). Die Auswertung erfolgte anhand einer einheitlichen Farbskala (C). Der GvHD-Score aller Versuchstiere (D) wurden stetig bestimmt.

Wie in der Gruppe KM+BCL-1 zu sehen ist (Abbildung 17A), wuchs das Lymphom nach einer Knochenmarktransplantation stark beschleunigt. An Tag zehn konnte dies bestätigt werden. Nach weiteren sieben Tagen zeigte sich das Lymphom bereits in der maximalen Ausprägung, sodass sich die

BLI-Bilder vollständig saturiert zeigten. Die ganze Maus stellt sich aufgrund des Bloomings (Kapitel 4.2.11) illuminiert dar. Der Allgemeinzustand der Versuchstiere nahm zunehmend durch den manifesten Progress des Lymphoms ab.

Die GvHD-Ausprägungen waren zunächst zur Kontrollgruppe KM identisch. Nach 14 Tagen beginnen die Kurven zu divergieren. Der GvHD-Score stieg in den drei Interventionsgruppen stetig. Die Parameter für Gewichtsverlust, körperliche Aktivität und Fellmorphologie kommen hier zum Tragen (siehe Tabelle 9 und Kapitel 4.2.13). Bei der Messung an Tag 22 hatte die KM+BCL-1 Gruppe bereits vorab die Euthanasiekriterien erreicht.

Dagegen war in der Gruppe KM+BCL-1+T-Zellen bis zu Tag 22 kein Tumorstadium zu erkennen. Die Farbskala ist vergleichbar mit den vorherigen Experimenten beginnend bei 1000 Counts. Das Lymphom wurde von den T-Zellen in signifikantem Ausmaß beeinflusst. Die Quantifizierung des absoluten Grauwerts ist in Abbildung 17E zu sehen. Im Verlauf des GvHD-Scores heben sich die zwei Gruppen der T-Zell-Gabe gegenüber den Mäusen ohne T-Zell-Transfer ab. Mit dem manifesten Progress des Lymphoms, einhergehend mit einer massiven Splenomegalie, der Einschränkung der körperlichen Aktivität und des Verhaltens, beginnen auch die Kurven von KM und KM+BCL-1 zu divergieren. Interessant ist auch der Unterschied zwischen Gruppe KM und Gruppe KM+T-Zellen. Nur die Kontrollgruppe (KM), welche alleine die Knochenmarktransplantation erhalten hatte, war aktiv und gesund. Diese Tiere hatten das Ausgangskörpergewicht am Versuchsende bereits wieder erreicht (nicht gezeigte Daten).

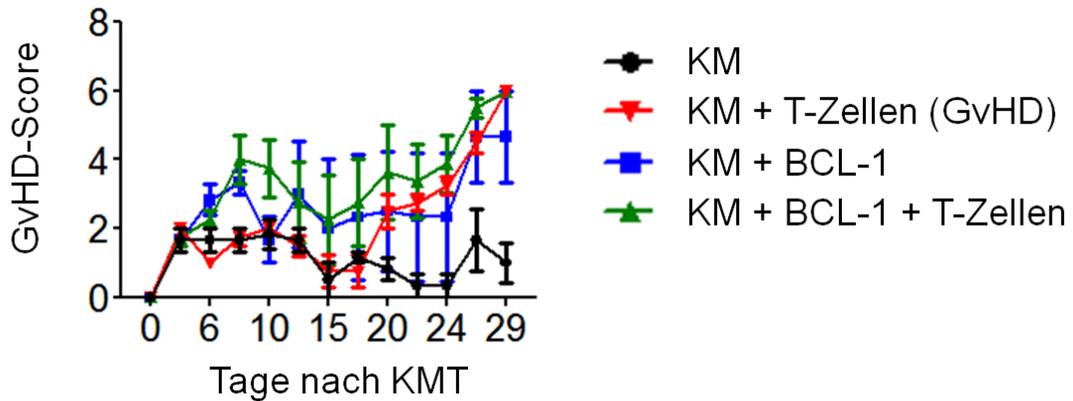


Abbildung 18: BCL-1-Luc⁺gfp⁺ und allogene Knochenmarkstransplantation (2)

Alle Versuchstiere erhielten an Tag 0 eine Bestrahlung mit 8,5 Gy und anschließend an Tag 1 eine Knochenmarkstransplantation von $5 \cdot 10^6$ T-Zell-freien Knochenmarkszellen. Die Kontrollgruppe (KM) wurde ohne weitere Intervention überwacht. Eine Versuchsgruppe erhielt an Tag 2 $1 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 tragende Pan-T-Zellen (KM+T-Zellen (GvHD)), einer Versuchsgruppe wurden an Tag 1 $0,2 \cdot 10^6$ aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 7 injiziert (KM+BCL-1) und eine Versuchsgruppe erhielt an Tag 1 $0,2 \cdot 10^6$ BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen und an Tag 2 $1 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 tragende Pan-T-Zellen (KM+BCL-1+T-Zellen). Die Darstellung zeigt die Daten von insgesamt 16 Versuchstieren (n=16). Der GvHD-Score wurde zweimal wöchentlich bestimmt. In der Biolumineszenz Bildgebung konnte in beiden BCL-1 Gruppen keine Lumineszenz an Tag 3, 6, 8, 10, 13, 25 und 28 detektiert werden. Die Bilder sind nicht dargestellt.

In einem analog durchgeführten weiteren Versuch (Abbildung 18) konnten die Beobachtungen hinsichtlich der Entwicklung des GvHD-Scores bestätigt werden. Die unbehandelte Gruppe (KM) und die Lymphom-tragende Gruppe (KM+BCL-1), jeweils ohne einen T-Zell-Transfer, erholten sich zunächst rasch. Der GvHD-Score für alle Versuchsgruppen ließ insgesamt eine höhere Heterogenität erkennen. Die beiden BCL-1 Gruppen (BCL-1, BCL-1+T-Zellen) wiesen zunächst einen höheren GvHD-Score auf. In der unbehandelten Kontrollgruppe (KM) konnte wie im vorherigen Experiment die geringste Ausprägung der GvHD festgestellt werden. Die GvHD in der T-Zell-transplantierten Gruppe KM+T-Zellen zeigte sich ab Tag 20. Durch Todesfälle in der BCL-1 Gruppe ohne T-Zell-Transfer stieg der Score zum Ende der Beobachtungsperiode deutlich an. Die GvHD war dennoch in den beiden Gruppen mit T-Zell-Transfer stärker ausgeprägt. Zudem wurden mehrere Messungen der Biolumineszenz durchgeführt. Es konnte keine Biolumineszenz detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

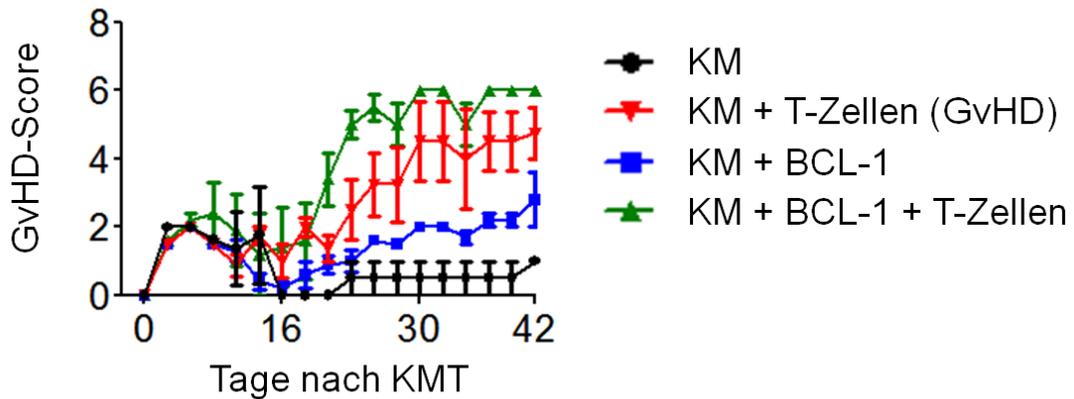


Abbildung 19: BCL-1-Luc⁺gfp⁺ und allogene Knochenmarktransplantation (3)

Alle Versuchstiere erhielten an Tag 0 eine Bestrahlung mit 8,5 Gy und anschließend an Tag 1 eine Knochenmark Transplantation von $5 \cdot 10^5$ T-Zell-freien Knochenmarkzellen. Die Kontrollgruppe (KM) wurde ohne weitere Intervention überwacht. Eine Versuchsgruppe erhielt an Tag 2 $0,6 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 tragende Pan-T-Zellen (KM+T-Zellen (GvHD)), einer Versuchsgruppe wurden an Tag 1 $0,2 \cdot 10^6$ aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 7 injiziert (KM+BCL-1) und eine Versuchsgruppe erhielt an Tag 1 $0,2 \cdot 10^6$ BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen und an Tag 2 $0,6 \cdot 10^6$ unstimulierte allogene CD3 tragende Pan-T-Zellen (KM+BCL-1+T-Zellen). Die Darstellung zeigt die Daten von insgesamt 18 Versuchstieren (n=18). Der GvHD-Score wurde zweimal wöchentlich bestimmt.

Im darauf folgenden Versuch wurden weitere Anpassungen vorgenommen, um die Stabilität, Homogenität und Aussagekraft der gewonnenen Erkenntnisse zu verstärken. Der Versuchsaufbau glich dabei den vorangegangenen Versuchen, es wurde ein längerer Nachbeobachtungszeitraum (42 Tage) sowie weniger BLI-Messungen in größerem zeitlichen Abstand geplant.

Wie erwartet verschlechterten sich alle Versuchstiere nach Bestrahlung und Transplantation an Tag 0 zunächst vorübergehend. Über alle Gruppen hinweg verbesserte sich bis Tag 12 die körperliche Verfassung wieder. BLI-Messungen ergaben keine wahrnehmbare Biolumineszenz der Lymphomzellen. Zwischen Tag 12 und 16 erholte sich die Kontrollgruppe (KM) deutlich schneller als die Interventionsgruppen. Ab Tag 16 divergierten die Versuchsgruppen deutlich im GvHD-Score auseinander. Die Kontrollgruppe (KM) und die KM+BCL-1 Gruppe zeigten eine bessere Gesundheit im Sinne eines niedrigeren GvHD-Score Punktwerts. Untypisch stieg der GvHD-Score aller Gruppen ab Tag 24 wieder kontinuierlich leicht an. Die KM+BCL-1 Gruppe blieb ab Tag 16 zunächst stabil, ab Tag 24 nahm der GvHD-Punktwert stetig zu. Wie erwartet zeigten die beiden GvHD-Gruppen (KM+T-Zellen, KM+BCL-1+T-Zellen) jeweils den gesundheitlich schlechtesten Verlauf mit höchstem Punktwert des GvHD-Scores. Die Gruppe KM+BCL-

1+T-Zellen entwickelte sich - wie aus den Ergebnissen der Vorversuche erwartet - am schlechtesten. Die BLI-Bilder beider Lymphom-tragenden Gruppen zeigten auch nach längerer Zeitdauer keine Biolumineszenz auf und wurden daher hier nicht dargestellt. Im weiteren Verlauf stieg der Punktwert des GvHD-Scores aller Gruppen in unterschiedlichem Ausmaß an. Die Kontrollgruppe (KM) zeigte die beste Gesundheit (niedrigster GvHD Score). Entgegen der bisherigen Beobachtungen konnten sich die Versuchstiere der Kontrollgruppe jedoch nicht wieder komplett auf das Niveau vor Transplantation erholen. Auch überlebten nicht alle Versuchstiere in der Kontrollgruppe. An Tag 42 musste der Versuch beendet werden, da zu viele Tiere die Abbruchkriterien erfüllten.

Die Beobachtungen über einen längeren Zeitraum zeigten zusammenfassend, dass beide Gruppen, welche T-Zellen erhalten haben (KM+T-Zellen und KM+BCL-1+T-Zellen), stets einen schlechteren Verlauf aufwiesen.

Die GvHD-Induktion im Tiermodell gelang erfolgreich, was anhand des Punktwerts im GvHD-Score dargestellt ist. Die BLI-Ergebnisse aus Abbildung 17 konnten in den Folgeversuchen weder bestätigt noch widerlegt werden, da eine aussagekräftige Darstellung der Biolumineszenz nicht gelang. Im GvHD-Score scheint sich eine Tendenz zu bilden, welche die in Abbildung 17 dargestellten Ergebnisse bestätigen. Dabei gibt es eine Graduierung zwischen BCL-1-Luc⁺gfp⁺-tragender GvHD-Gruppe (KM+BCL-1+T-Zellen) und nicht-Lymphom-tragender Gruppe (KM+T-Zellen).

6 Diskussion

Das Immunsystem zerstört maligne Zellen und bremst das Tumorwachstum (Elimination). In diesem Zusammenhang prägte jedoch Robert Schreiber Anfang der 2000er Jahre den Begriff des cancer immunoediting [48]. Durch die dabei verwendeten Mechanismen selektioniert es Tumorzellen nach dem darwinistischen Prinzip und erzeugt zunächst ein Gleichgewicht (Equilibrium) [22]. Zellen, welche in einem immunkompetenten Körper besser den Angriffen des Immunsystems entkommen, werden für weiteres Wachstum ausgewählt (Escape). Auch die Umweltbedingungen werden durch Effektorzellen des Immunsystems verändert. Schreiber *et al.* beschreiben, dass durch eine Veränderung des tumor microenvironment, der mikroskopischen Umweltbedingungen innerhalb des Tumors, auch das Tumorwachstum an sich gefördert werden kann [48, 131].

Primär ist das Immunsystem zum Schutz vor Infektion und Mutation angelegt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindrucksvoll, wie NK-Zellen immunmodulatorisch und zytotoxisch wirksam sind. Durch eine Stimulation und Aktivierung mit Interleukinen kann dieses Potential weiter vergrößert werden. Mittels der Methode der Biolumineszenz-Bildgebung konnte das verwendete diffus großzellige B-Zell-Lymphom im *in vivo* Tiermodell nicht-invasiv erfasst und das Größenwachstum beurteilt werden. Nach adoptivem Transfer zeigt eine direkte Interaktion von BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen und allogenen NK-Zellen keine ausreichend hohe Elimination. Doch der Einsatz von allogenen T-Zellen oder NK-Zellen im Kontext der hämatopoetischen Stammzelltransplantation kann dies gewährleisten. Vor allem in einem Konzept der allogenen Transplantation können die T-Lymphozyten jedoch erhebliche unerwünschte Wirkungen im Sinne einer GvHD induzieren. NK-Zellen können die Elimination (GvL) additiv fördern und parallel die unerwünschten Wirkungen (GvHD) reduzieren. Hierfür müssen NK-Zellen in ausreichender Zahl aufgereinigt werden können.

Die in dieser Arbeit erreichbare Reinheit der magnetisch aufgereinigten NK-Zellen aus den C57BL/6 Splenozyten schwankte zwischen 60 und 90 %. Zur

Aufreinigung diente das von Miltenyi Biotech entwickelte Mouse NK Cell Isolation Kit. Damit war eine schnelle und praktikable magnetische Negativ-Selektion möglich. Das Kit bringt dabei unberührte NK-Zellen als Resultat hervor, da die Biotin-Antikörper und schließlich die magnetischen Microbeads nur an den nicht erwünschten Zellen ansetzen (siehe Kapitel 4.2.4). Vorteil dieser Methode ist, dass eine mögliche Aktivierung oder eine andere Manipulation an den Zellen unterbleibt [109]. Dieses Kit war zum Zeitpunkt der Experimente ursprünglich anhand eines weißen (Balb/c) Mausstamms entwickelt worden. In dieser Arbeit wurden Einzelzellsuspensionen von schwarzen (C57Bl/6) Mäusen angefertigt, wodurch die Diskrepanz der dargestellten Reinheit der NK-Zellen zu erklären ist. Wie in Abbildung 6 gezeigt, waren teilweise nur circa 60% der verwendeten Zellen tatsächlich NK-Zellen. Das Mouse NK Cell Isolation Kit ist mit seiner indirekten Isolation den anderen Verfahren allerdings überlegen. Ein Teil dieser Ergebnisse wurde aus unserer Arbeitsgruppe bereits von Meinhardt *et al.* veröffentlicht [109].

Auch die Auswahl der analysierten Zellen in der Durchflusszytometrie wirft die Frage auf, wie sehr das Gating die endgültigen Ergebnisse beeinflusst. Experimente dieser Arbeit wurden stets manuell ausgewertet. Um eine Vergleichbarkeit zu wahren, wurden ähnliche, zeitgleiche, oder serielle Experimente mit gleichen Gates versehen. Dies führte konsekutiv zum Ergebnis, dass nicht alle Populationen optimal erfasst wurden. Eine klare Abgrenzung in den Stadien des Zelluntergangs ist nicht immer eindeutig möglich. Wie Hauser *et al.* anmerkten, sind die Marker zur Isolation sorgsam zu wählen. Nach Auswahl von CD14⁺-Zellen als übergeordnetes Lymphozyten-Gate werden (humane) NK-Zell-Subpopulationen weiterhin mit CD16 und/oder CD56 tragenden Makrophagen Subpopulationen verunreinigt [77]. Da sich dies nur im einstelligen Prozentbereich auswirkt, gilt der Einfluss des Gatings als vernachlässigbar.

In der Gatingstrategie (Abbildung 14A) wurden grenzwertig vitale BCL-1-Luc⁺gfp⁺ eingeschlossen, welche noch gfp⁺ exprimierten und PKH-67 auf ihrer Oberfläche trugen. Ein größeres Gate zum Einschluss von mehr Zellen

war nicht möglich. Zum Teil wären NK-Zellen selbst mit in die Analyse einbezogen worden. Andererseits hätten auch verunreinigte (Tumor-)Zellen und Zellbestandteile die Auswertung der Apoptose und Nekrose verfälscht. Der Prozentsatz der Lyse liegt für alle 3 Zeitpunkte ungefähr gleich hoch. Dies kann zum Teil auch aufgrund der veränderten Gatingstrategie erklärt werden.

Wie Nogusa *et al.* aufzeigten, hat das Alter der Versuchstiere einen Einfluss auf immunologische Prozesse. Nach Zytokin-Stimulation alleinig oder in unterschiedlichen Kombinationen aus IL-2, IL-12, IL-15 oder IL-18 konnte eine gesteigerte IFN- γ Produktion, eine erhöhte Zytotoxizität und eine vermehrte Granzym B Produktion in jüngeren Tieren festgestellt werden. Entgegen eigener Ergebnisse zeigte die Arbeitsgruppe um Nogusa eine vermehrte IFN- γ Produktion nach alleiniger Stimulation mit IL-15 [114]. Die angewandte Dosis wich jedoch von der hier verwendeten Dosis ab (20ng gegenüber 25ng pro $1 \cdot 10^6$ NK-Zellen). Eigene Ergebnisse zeigen im Gegensatz dazu nach 24 Stunden IL-15 Stimulation eine signifikant verminderte IFN- γ Produktion (siehe Abbildung 8). Bei Nogusa *et al.* wird ebenfalls signifikant nach IL-15 Stimulation eine verminderte Produktion von IFN- γ , eine reduzierte Zytotoxizität und eine verminderte Granzym B Produktion in älteren Tieren gezeigt. Das Alter ist bei den eingesetzten Versuchstieren dieser Arbeit zu vernachlässigen, da stets Jungtiere mit gleichem Alter zwischen 8 und 10 Wochen gewählt wurden. Auch der Einfluss des Geschlechts wurde ausgeschlossen, da nur weibliche Versuchstiere verwendet wurden. Über den Einfluss des Hormonhaushalts der weiblichen Versuchstiere auf die Ergebnisse herrscht bisher Unklarheit.

Die Diskriminierung von NK-Subpopulationen ist teilweise strittig. In der NK-Zell-Entwicklung deuten verschiedene Oberflächenmarker die einzelnen Entwicklungsstadien, sowie phänotypischen und funktionellen Unterschiede an. CD27, CD11b und CD117 sind hierbei im murinen Modell entscheidend. CD11b, CD43 und CD49b sind Marker für mature entwickelte NK-Zellen. NK-Zellen von CD27-naiven Knockout Mäusen entwickeln CD27⁺ mature NK-Zellen wie die Gruppe um de Colvenaer *et al.* zeigen konnte [41]. Die

Funktion der unterschiedlichen Subpopulation ergibt sich zum Teil auch aus ihrem Reifungsstadium. Walzer *et al.*, sowie Vivier *et al.* sind aktiv an der Weiterentwicklung der Erkenntnisse zur Reifung der Subpopulationen beteiligt. Neue Ergebnisse scheinen die Hypothese zu bestärken, dass CD27⁻CD11b⁻ NK-Zellen die unreifste Population sind und keine hinreichende Funktion vermitteln können. In der Ausreifung folgt die CD27⁺CD11b⁻ Population, welche ebenfalls gut in Abbildung 7 dargestellt ist. Folgend reifen die Zellen zu CD27⁺CD11b⁺-Zellen und anschließend zu CD27⁻CD11b⁺-Zellen. Den CD27⁻CD11b⁺-Zellen wird das höchste Potential an Effektorzellfunktion zugesprochen [29]. In weiteren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die CD27⁻CD11b⁺-Zellen auch die Protektion gegenüber einer GvHD vermitteln können [110].

Im Grundsatz bestehen Probleme in der Konversion von Ergebnissen eines *in vitro* Versuchs auf ein klinisches multifaktorielles Geschehen. Versuche mit humanen NK-Zellen finden hauptsächlich *in vitro* statt. Tiermodelle zu entwickeln oder bestehende Modelle zu etablieren ist zeitaufwendig und teilweise sehr komplex. Der Einsatz im Menschen ist auf Grund von ethischen Hürden sehr hoch. Harada *et al.* gelang es, humane NK-Zellen in einem *in vivo* NOD/SCID Mausmodell zu entwickeln. Hierfür wurden mononukleäre Zellen (CBMC) aus Nabelschnurblut in die Mäuse eingebracht. Daraus entwickelten sich reife humane CD56^{dim}CD16^{high} zytotoxische und CD56^{bright}CD16^{low} (immunmodulierende) NK-Zellen, welche im peripheren Blut anhand von gfp⁺ verfolgt werden konnten [72].

Im *in vivo* Tiermodell konnten Chenoweth *et al.* zeigen, dass IL-15 über verschiedenste Kaskaden (IL-15R α , c-Jun N-terminale Kinasen und NF- κ B) einen Einfluss auf die Zell-Zellinteraktion der immunologischen Synapse hat. In RAG-2 Mäusen zeigten sie, dass die IL-15 Signaltransduktion in Lymphozyten und NK-Zellen scheinbar anders verläuft, als in myeloischen Zellen. Eine Transpräsentation von IL-15 über IL-15R α auf der Oberfläche von dendritischen Zellen erhöht zudem indirekt die IFN- γ Produktion von NK-Zellen. *In vivo* können DC-Zellen hier ihre ko-stimulatorischen Aufgaben unter Beweis stellen [28]. Dies bietet auch einen Erklärungsansatz für die in

Abbildung 11 dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit. Nach IL-15 *in vivo* Applikation nimmt die *in vitro* Lysekapazität von NK-Zellen zu. Dies kann auch durch eine höhere Expression von RANTES zu erklären sein [28]. Alleinig eine Applikation von IL-15 kann eine Maus bereits vor einer sonst letalen HSV-2 Infektion oder einer Metastasierung von B16F10 Melanomzellen bewahren [28].

Wie Elpek *et al.* beschreiben, führt eine *in vivo* Stimulation mit IL-15 zu einer Steigerung der Effektorzellfunktionen. Allerdings führt dies über einen längeren Zeitraum zu einer vermehrten Ausreifung der NK-Zellen [51]. In der vorliegenden Arbeit konnten analoge Ergebnisse gezeigt werden (siehe Abbildung 7). Diese überreifen Zellen scheinen jedoch in ihrer Funktion beeinträchtigt zu sein. Elpek *et al.* postulieren hier eine Rückkopplungsschleife, sodass die NK-Zell-Aktivität entsprechend im Organismus *in vivo* reguliert wird. Dies hätte bedeutenden Einfluss auf eine klinische Zytokintherapie [51]. *In vivo* Daten dieser Arbeit demonstrieren ebenfalls einen Shift in der Population zu CD11b⁺ NK-Zellen. Auch CD8⁺-T-Zellen entwickeln nach einer dauerhaften IL-15 Stimulation eher einen hochaktiven Phänotyp. Dass NK-Zellen nach IL-15 Stimulation ausreifen, konnte in dieser Arbeit ebenfalls aufgezeigt werden. Wie in Abbildung 11 dargestellt ist, reifen murine NK-Zellen nach IL-15 Stimulation hin zur CD27⁻CD11b⁺-Subpopulation aus. Wie Cooper *et al.* aufzeigten, können durch eine Zytokin-Stimulation sogar Gedächtnis-ähnliche NK-Zellen induziert werden. Ob diese ähnlich oder vergleichbar zu Gedächtnis-T-Zellen sind, wird kontrovers diskutiert [35].

Für die Zytokin-Stimulation unter Laborbedingungen wäre eine dauerhafte NK-Zellkultur mit vergleichbarem Verhalten zu frisch aufgereinigten Zellen von großem Wert. Um eine ausreichende Zellzahl zu erreichen, werden Methoden etabliert, die nicht nur die Expansion von muren NK-Zellen fördern, sondern auch gleichzeitig die Entwicklung von NK-Zellen aus Vorläuferzellen fördern, wie bei NK-Zell-Präparaten aus Nabelschnurblut Zellen (UCB) [73]. Für den Einsatz in einem allogenen Konzept spielt die Vermehrung über eine Zellkultur eine entscheidende Rolle, um ausreichende

Zellzahlen zu erreichen und die klinischen Abläufe zu optimieren. Diese Expansion von NK-Zellen ist Gegenstand intensiver Forschung. Es gelang trotz vielversprechender Vorversuche im Zeitraum dieser Arbeit nicht, NK-Zellen über einen längeren Zeitraum im Labor *in vitro* zu kultivieren. Die Zellen verlieren innerhalb eines kurzen Zeitraums ihre Viabilität. Dies beeinflusst die Zytokin-Stimulation, da eine längere Zeitdauer zu weniger vitalen NK-Zellen führt. Die Ergebnisse mit NK-Zellen aus Zellkultur zeigten erhebliche Abweichungen zu denen mit frisch aufgereinigten Zellen (nicht gezeigte Daten). Andere Arbeitsgruppen scheinen ebenfalls Schwierigkeiten mit einer Zellkultur und der Proliferation von NK-Zellen zu haben. Fujisaki *et al.* modifizierten eine Leukämiezelllinie, um IL-15 transmembranär zu präsentieren. Nach Bestrahlung dieser Zellen konnte nach 7 Tagen Ko-Stimulation eine 21-fache Vermehrung von funktionstüchtigen (humanen) (Blut-)NK-Zellen erreicht werden [59]. Nur durch diese Transpräsentation, Dauerstimulation und Aktivierung in Ko-Kultur von NK- und Tumor-Zellen konnte eine Proliferation der NK-Zellen erreicht werden. Die Arbeitsgruppe um Olson *et al.* hat gezeigt, dass durch Einsatz eines entsprechenden Mediums die Viabilität länger erhalten werden kann. Sogar eine geringe Proliferation war möglich [116]. Es wurde IL-2 verwendet, da NK-Zellen nach IL-2 Stimulation aktiviert werden und bei geringen Konzentration die Viabilität gesteigert ist. IL-2 ist zudem eine der am besten untersuchten Stimulatoren des Immunsystems. Eine NK-Zellkultur kann mit einem veränderten R10-Medium analog der Gruppe um Olson *et al.* weiter untersucht werden. Einzelne Experimente wurden dazu in der Arbeitsgruppe bereits durchgeführt. Hierbei ist auch der Einsatz von IL-15 in dieser Umgebung zukünftig geplant.

Die Aktivierung von NK-Zellen mit *in vivo* Poly I:C, hohen Dosen *in vitro* IL-2 Dosen oder anderen Toll-like-Rezeptor-stimulierenden Substanzen beeinflusst die *in vitro* Produktion von IFN α , β und γ [47]. Dieser Mechanismus kann über autokrines IFN- β von NK-Zellen teilweise selbst reguliert werden. NK-Zellen können immunmodulatorisch selbst IL-10 und IL-13 herstellen [100]. Über IL-10 kann so eine inflammatorische (eventuell überschießende) Reaktion des Immunsystems vermindert werden. Geringe

Dosen IL-2 tragen zu einer geringen Proliferation und zum Überleben von NK-Zellen in Zellkultur bei [68]. Zu diesem Zweck wurde IL-2 maßgeblich als Stimulans und Zusatz in dieser Arbeit eingesetzt.

Kontrovers diskutiert wird die einzusetzende Zellzahl von NK-Zellen im adoptiven Transfer oder anderen Zelltherapien. Erste translationale Projekte sind dazu bereits gestartet. In Frankfurt am Main wurden erste adoptive Transfers von allogenen NK-Zellen in der klinischen Praxis in der pädiatrischen Onkologie angewendet [93]. Hierbei wurden absolute Zellzahlen von $234 \cdot 10^6$ bis $1237 \cdot 10^6$ CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen erreicht und eingesetzt. Verbesserungen im graft engineering, der Technologie der Zellanreicherung, erlauben die Anwendung hoher Zellzahlen beim klinischen Einsatz von NK-Zellen. Es konnten Zellzahlen bis zu 10^7 NK-Zellen pro Kilogramm Körpergewicht der pädiatrischen Patienten erreicht werden.

Neuere *in vitro* Ergebnisse scheinen einen Einsatz auch in der Immuntherapie von hämatologischen Erkrankungen möglich zu machen. Hierbei scheint das in dieser Arbeit untersuchte IL-15 eine wichtige Rolle zu spielen. Ähnlich den Ergebnissen von Fujisaki *et al.* konnten Garg *et al.* beschreiben, dass eine NK-Zell-Expansion nach Ko-Kultur mit einer Tumorzelllinie möglich war. Diese Tumorzelllinie exprimiert nach retroviraler Transfektion ein membranständiges IL-15. Nach Expansion wiesen die NK-Zellen eine außerordentliche zytotoxische Aktivität gegenüber autologen und allogenen Zellen eines multiplen Myeloms auf. Zusätzlich wurden diese stimulierten NK-Zellen in einem adoptiven Transfer Mäusen injiziert. Hier waren die NK-Zellen für über 4 Wochen nachweisbar und zeigten eine IL-2 abhängige Proliferation [60]. Die IL-2 Abhängigkeit wurde bei *in vitro* Versuchen (siehe Kapitel 5.2) dieser Arbeit ebenfalls deutlich.

Für den klinischen Einsatz der NK-Zellen müssen die physiologischen und molekularen Prinzipien vor allem der Zytotoxizität weiter erforscht und bestätigt werden. Klassischer Weise wird die Spezifität gegen Zielzellen nur den B- oder T-Lymphozyten zugeschrieben. Wenn man den Begriff der Spezifität etwas weiter fasst, sind auch NK-Zellen spezifisch. Sie sind in der Lage ein einzigartiges Antigen eines spezifischen Pathogens selektiv und

zielsicher zu erkennen. Als Beispiel hierfür kann der Ly49H Rezeptor angesehen werden, welcher auf einer Subpopulation der NK-Zellen ausgeprägt ist. Er bindet spezifisch ein membranständiges Glykoprotein (m157) eines murinen CMV. Ly49H erkennt dabei keine anderen Liganden eines anderen Virus. Knockout Mäuse ohne Ly49H können murine Cytomegalieviren nicht erkennen [1, 5, 20, 137].

Laut Yokoyama *et al.* reicht bereits eine E:T-Ratio von bis zu 10:1 aus, um bei aktivierten angereicherten NK-Zellen die maximale Lyserate zu erreichen. Dies konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Es traten bei einer Steigerung auf eine E:T von 20:1, nach vorheriger Aktivierung durch Zytokin-Stimulation, nur noch marginale Unterschiede auf (siehe Abbildung 10). Eine weitere Anhebung der E:T-Ratio steigert die erreichbare Eliminationsrate nicht weiter (nicht gezeigte Daten). Dies liegt zum Einen an dem beschränkten Probenvolumen von 200µl pro Well und zum Anderen an der eingeschränkten Interaktionsfläche der NK-Zellen mit den Tumorzellen. Eine E:T-Ratio von 20 zu 1 wurde aus Vorexperimenten der Arbeitsgruppe als maximal angesehen.

Yokoyamas weitere Beschreibungen von der Notwendigkeit sehr hoher E:T-Ratios bei unstimulierten NK-Zellen zum Erreichen einer ausreichenden Elimination konnten ebenfalls bestätigt werden. Analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit beschrieb Yokoyama, dass eine maximale Lyse, wie sie von spezifischen Zellen erreicht wird, bei NK-Zellen so nicht vorzufinden ist. Die Variabilität reicht von 10% Lyserate bei naiven NK-Zellen bis maximal 60-80% bei voraktivierten Zellen [167]. In weiterführenden Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe zeigten Meinhardt und Kröger *et al.*, dass die hauptsächliche Elimination im murinen Modell von CD27⁻CD11b⁺ NK-Zellen induziert wird (circa 60% Elimination von B16F10 Melanomzellen bei einer E:T-Ratio von 5:1). Dagegen weist die CD27⁺CD11b⁻ Subpopulation eine deutlich geringere Lyserate bei gleicher Verteilung E:T auf (25%). Die geringste Rate scheinen c-kit⁺ NK-Zellen zu vermitteln (20%) [110]. Insgesamt ist die Zytotoxizität effizienter in der Anwesenheit von supportiven Zellen, um mehr Interaktionsmöglichkeiten zur Verfügung zu haben [159].

Die statischen Zuordnungen zum angeborenen und adaptiven Immunsystem werden von mehreren Autoren hinterfragt. Nach neueren Erkenntnissen besitzen NK-Zellen auch adaptive Elemente. Sie haben wahrscheinlich eine Art Infektions-Gedächtnis. Damit entsprechen sie auch der Formulierung adaptiv. In murinen Experimenten zur Hypersensitivität ergaben sich in der Arbeitsgruppe von Andrian *et al.* erste Erkenntnisse, dass auch NK-Zellen ein Gedächtnis für voran gegangene Reaktionen haben können. Die Unterschiede wurden beim Vergleich von RAG und RAG2 Mäusen entdeckt. RAG Mäuse besitzen keine B- und keine T-Lymphozyten, während RAG2 Mäuse durch die doppelt fehlende IL-2 Rezeptor γ -Kette weder B-, noch T-Lymphozyten, noch NK-Zellen besitzen [115]. Das Gedächtnis konnte experimentell über einen adoptiven Transfer von Leber NK-Zellen in naive RAG2 Mäuse weitergegeben werden. Noch nach über einem Monat wurde die spezifische Reaktion auf das vorab sensibilisierte Agens (Hapten) beobachtet. Auch O`Leary *et al.* beschreiben in ihren Forschungsarbeiten eine mögliche sekundäre Antwort von (Leber-) NK-Zellen. Der zugrunde liegende Mechanismus dafür ist bislang noch ungeklärt. Warum bei NK-Zellen diese Fähigkeit in den Jahrtausenden der Evolution nicht weiter selektioniert wurde, bleibt unklar [76, 141, 165].

In einem CMV Maus Modell konnte durch Sun *et al.* gezeigt werden, dass auch weitere Bestandteile der adaptiven Immunantwort in NK-Zellen vorhanden sind [146]. Es konnte eine Proliferation von adoptiv transferierten NK-Zellen und eine Art NK-Gedächtniszellen zumindest für Monate nachgewiesen werden. Diese Gedächtnis-NK-Zellen konnten reaktiviert werden und schütteten mehr IFN- γ aus, als die naiven Host-NK-Zellen. Nach Sun *et al.* ist somit eine sekundäre Immunantwort sichtbar und nachgewiesen. Die vorstimulierten Gedächtnis-NK-Zellen seien reaktiver und protektiver gewesen verglichen zu den naiven NK-Zellen, wenn man die Viruslast des Organismus verfolgt. Die reaktive (sekundäre) Gedächtnisantwort scheint quantitativ pro Zelle geringer auszufallen als bei den naiven Vergleichszellen. Viele Erkenntnisse sprechen dafür, dass aktivierte NK-Zellen zum Teil die angeborene und adaptive Immunantwort miteinander verbinden.

Die Aktivierung von Effektorzellen zeigt auch Einflüsse auf die molekulare Ordnung. Dies wird besonders bei T-Zellen deutlich. Wie in Micro-Array Studien nachgewiesen wurde, verändern diese ihre molekular-genetische Ausprägung, sobald sie aktiviert wurden und in die Expansion übergehen [83]. Laufende Experimente sind dabei diesen Effekt auch in NK-Zellen nachzuweisen. Sie untersuchen die Genexpression bei ruhenden, aktivierten und Gedächtnis-NK-Zellen [147]. Bei B- und T-Lymphozyten wurden microRNAs (miRNA) in der Translation von Proteinen entdeckt, welche das Endprodukt verändern. Ähnliche Mechanismen werden bei NK-Zellen vermutet. Fehniger *et al.* untersuchten dafür miRNA (beziehungsweise das Transkriptom der NK-Zellen) mittels next generation sequencing, microarray Analysen und quantitativer real-time PCR. Sie konnten neben 302 bekannten auch 21 neue miRNA von NK-Zellen ausmachen, welche zum Teil in die Translation von Granzym B eingreifen [52].

Innerhalb unserer Arbeitsgruppe konnten anhand von eigenen microarray Analysen klare Unterschiede in den Genexpressionsmustern muriner NK-Zell-Subpopulationen gefunden werden. Die Chemokin-Rezeptoren CCR7, CXCR3 und CCR2 korrelieren mit den Genexpressionsmustern der NK-Zell-Subpopulationen [110]. Dies deutet auf grundlegende Unterschiede im Verhalten bei Migration, Immunmodulation und Zytotoxizität hin. Ähnliche Genexpressionsmuster kommen ebenfalls in anderen Zellen des angeborenen Immunsystems vor [166]. Ein größeres Verständnis der molekularen Prozesse in der Elimination von malignen Zellen bringt auch ein besseres Verstehen der Abläufe nach hämatopoetischer allogener Stammzelltransplantation mit sich. Somit kann das Engraftment, Überleben und die resultierenden Funktionen gegen infektiöse pathogene Viren, welche zu den schwerwiegendsten Komplikationen nach allogener Stammzelltransplantation führen können, besser verstanden und gegebenenfalls an entsprechender Stelle manipuliert werden.

Interessant für die Fragestellung im Tumormodell sowie nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation ist die Rezeptor-Interaktion in der Zellerkennung, die immunologische Synapse. Die Bestimmung von

Organismus-eigenen gegenüber Organismus-fremden Bestandteilen ist ein zentrales Thema in der Biologie von Pflanzen bis zum Wirbeltier. Es wird davon ausgegangen, dass die Bindung einzelner aktivierender und inhibierender Rezeptoren in der Zell-Zell-Interaktion das Gesamtbild der Bindung ausmachen und zur potentiellen Effektorzellfunktion führen. NK-Zellen besitzen eine Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen. Wie Fernandez *et al.* zeigten, scheint dies nicht alleinig von inhibitorischen Signalen nach Bindung mit MHC-I Rezeptoren abhängig zu sein. NK-Zellen zeigen auch ohne inhibitorische Rezeptoren gegen eigene MHC-I Oberflächenmoleküle eine Selbsttoleranz [55]. Auch können NK-Zellen funktionell aktiv werden nachdem sie in Bindung von inhibitorischen Rezeptoren und Host MHC-I Molekülen lizenziert wurden. Es gibt nach Kim *et al.* dann zwei Arten von NK-Zellen mit Toleranz gegenüber körpereigenen Zellen, lizenzierte NK-Zellen und unlizenzierte, was neue Möglichkeiten zum Eingriff in der Immuntherapie eröffnet [91].

Um autoimmune Prozesse zu vermeiden, durchlaufen B- und T-Zellen einen Reifungsprozess. Für T-Zellen ist dies die Thymuspassage. Von Sun und Lanier wird postuliert, dass es für NK-Zellen einen ähnlichen Prozess gibt, welcher bisher nicht entdeckt wurde. Hierfür wurde ein Glykoprotein (m157), welches physiologisch auf murinen CMV vorkommt, retroviral in die Knochenmarkstammzellen einer Maus eingebracht. Das Protein m157 wird von Ly49H erkannt, welches auf NK-Zellen ausgebildet ist. Im Fall der Erkennung führt diese zu einer starken Aktivierung und Elimination des murinen CMV. Nach der Transfektion der Knochenmarkstammzellen zeigte sich der Anteil an Ly49H tragenden NK-Zellen im Blut signifikant vermindert. Die verbleibenden Ly49H NK-Zellen schienen zudem weniger aktiviert, weniger ausgereift, produzierten weniger Interferon- γ und waren nicht mehr in der Lage, m157 tragende Zellen zu eliminieren. Sun *et al.* gehen davon aus, dass es regulatorische Mechanismen gibt, welche unreife NK-Zellen nach Interaktion mit aktivierenden Rezeptoren in einen inaktivierten Zustand zurück versetzen [148].

Nach Tripathy *et al.* verursacht die dauerhafte Stimulation mit einem stark aktivierenden Signal bei reifen NK-Zellen eine Art Toleranz, beziehungsweise dynamische Anpassung. Zudem scheinen zusätzliche inhibitorische Signale

bei der Interaktion mit MHC-I-Rezeptoren nötig zu sein, um eine vollständig ausgeprägte Effektorzellfunktion zu entfalten. Ohne diese zusätzlichen Signale sind sie weniger reaktiv und es kommt zu einer verminderten Zellantwort [156]. Nur das Verständnis des Gesamtgefüges an Rezeptor-Bindungen zu einem definierten Zeitpunkt erlaubt eine Aussage bezüglich des jeweiligen NK-Zell-Verhaltens und der klinischen Relevanz.

Die Aktivierung, Inhibition, Proliferation und Homöostase der NK-Zellen werden durch Signaltransduktion weiter gegeben. Die regulatorischen Signalkaskaden der NK-Zell-Effektorfunktionen sind bisher nur wenig untersucht. Der im Mausmodell wichtige Ly49H Rezeptor ist assoziiert mit dem immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-bearing adaptor protein, welches aktivierende Signale über die Syk-Familie Kinasen vermittelt [148]. Generell besteht in der Manipulation der Balance zwischen inhibitorischen und aktivierenden Signalen und dem eventuell pharmakologischen Eingriff in die Signalkaskade ein hohes Potential für die klinische Anwendung. Unter dem modernen Janus Kinasen (JAK) Inhibitor Ruxolitinib treten in der klinischen Anwendung häufiger Infektionen auf. Neue Ergebnisse von Schönberg *et al.* zeigen, dass dies zum Teil durch eine verminderte NK-Zell-Anzahl und -Funktion erklärt werden kann. Unter der Behandlung mit Ruxolitinib traten bei Patienten mit myeloproliferativen Neoplasien (MPN) vermehrt unreife NK-Zellen zum Vorschein. *In vitro* Versuche zeigten, dass nach Ruxolitinib Einwirkung die NK-Zell-Aktivierung nach Zytokin-Stimulation vermindert ist. Daraus resultierend ist auch die Eliminationskapazität der NK-Zellen eingeschränkt [130].

Ein weiterer Ansatzpunkt ist der Einsatz von Histon-Deacetylase Inhibitoren (HDAC). In Krebszellen sind Histone übermäßig acetyliert. Die HDAC-Inhibitoren zeigten in frühen Phase I und Phase II Studien gute Ergebnisse gegenüber verschiedenen hämatologischen und onkologischen Erkrankungen. Nach neuesten Ergebnissen scheint dies auch an einer gesteigerten Effektivität von NK-Zellen zu liegen. Die Liganden (MIC A und B) für den aktivierenden Rezeptor NKG2D (auf NK-Zellen) werden *in vitro* nach dem Einsatz von Entinostat, einem HDAC Inhibitor, vermehrt auf den Tumorzellen exprimiert [170]. Einen ähnlichen Effekt scheint auch eine

ionisierende Bestrahlung zu haben. Durch die Kombination von Bestrahlung und HDAC Inhibitor scheint die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen besonders verstärkt zu werden [140].

Der Weg in Richtung zielgerichteter onkologischer Therapien geht von systemisch wirkenden Zytostatika hin zu immunregulatorisch wirkenden modernen Medikamenten und Biologicals, wie monoklonale Antikörper, kleine Moleküle (small molecules), Fusionsproteine, chimäre Antigenrezeptoren (CARs) und bispezifische Antikörper (BiTEs). Bei der chronisch myeloischen Leukämie haben besonders die Tyrosinkinase Inhibitoren (TKI) einen Quantensprung bezüglich der Mortalität und Lebenserwartung betroffener Patienten gebracht. Einen signifikanten Anteil daran scheinen die NK-Zellen zu haben. Ohne NK-Zellen fiel der therapeutische Antitumoreffekt von Nilotinib, einem TKI, bedeutend geringer aus. Ergebnisse dieses Einflusses von NK-Zellen wurden aus unserer Arbeitsgruppe von Geisler *et al.* untersucht und publiziert [61].

NK-Zellen werden bereits in kleinen Gruppen im allogenen klinischen Konzept eingesetzt. Miller *et al.* berichteten, dass eine alleinige Gabe von NK-Zell-angereicherten Produkten in einer haploidentischen hämatopoetischen Stammzelltransplantation nicht zu einer Entwicklung einer Graft-versus-Host Erkrankung führt. Durch alleinigen Einsatz dieser Zellprodukte zeigte sich eine beachtliche Remissionsrate von 30% bei Patienten mit Chemotherapie-refraktärer AML. Da Miller *et al.* ebenfalls eine *in vivo* Proliferation im Menschen nachweisen konnten, gehen sie davon aus, dass dieser Effekt von der Expansion der NK-Zellen herrührt [112]. Es gibt eine Vielzahl weiterer Faktoren, die einen Einfluss auf NK-Zellen im Rahmen der allogenen Transplantation haben, wie Geschlecht und Rasse, Blutgruppe, HLA Identität, sowie Virusserologie des Zellspenders und Empfängers. Beispielsweise scheinen männliche Erwachsene japanischer Herkunft gegenüber Kaukasiern eine höhere NK-Zellzahl im peripheren Blut aufzuweisen [133].

Das Biolumineszenz-Signal war mit den eingesetzten Geräten etwas heterogen. Die Ursachen hierfür sind multifaktoriell. Contag *et al.*

untersuchten die Verteilung und Detektion von Luziferin in einer limitierten Studie. In ihrer Arbeit wird demonstriert, dass Luziferin gut in Gewebe migriert und die Genexpression nach einer viralen Luziferase Transfektion stabil ist [33]. Die Genexpression der in dieser Arbeit verwendeten BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphom-Zellen war ebenfalls stabil, wie Hardy und Edinger et al. zeigen konnten [74]. Wie Cui *et al.* in einer Studie zur Signalqualität und Ausbreitung zeigten, ist die Lichtausbreitung durch das umgebende Gewebe heterogen. Die Positionierung der Versuchstiere spielt eine große Rolle. Auch Anästhesieverfahren und Zeitablauf beeinflussen das Signal. In größeren Tumoren wird die maximale Ausbreitung des Lichts etwas später erreicht [39]. Insgesamt ist das BLI ein ausgezeichnetes Verfahren, welches zügig Bilder produziert und nur zu sehr wenigen Anästhesie-bezogenen Todesfällen führte. Eine kontinuierliche Langzeitbeobachtung eines Tumorwachstums ist mit anderen Verfahren nur schwer möglich. Auch in der Anwendung ist das BLI ein sicheres Verfahren. Bedenken um das Risiko von Luziferin selbst sind bereits analysiert worden, wobei die Toxizität als sehr gering eingeschätzt wurde [32]. Die hauptsächliche Limitation des BLI ist die Anwendung im lebendigen dynamischen Organismus. Die Gewebetiefe der Biolumineszenzquelle beeinflusst die Absorption maßgeblich. Das Hämoglobinmolekül absorbiert eine große Menge an blauem und grünem Licht [124]. Gut perfundierte Organe können so schlechter dargestellt werden. Besonders bei niedriger Signalintensität kann es zu Interferenzen kommen. Zudem ist die Ausbreitung des Lichts von der Lage des Gewebes zum Sensor abhängig. Alleinig eine leicht andere Position der Milz intraabdominell verändert das Signal und die Intensität. Eine aus dem Überlagerungsbild abgeleitete Auswertung kann demnach nur semiquantitativ sein.

Durch die unvorhergesehene Entwicklung der Versuchstiere sind die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar. Durch häufigere Vollnarkosen zeigten sich die Tiere subjektiv aggressiver mit zunehmender Dauer der Beobachtung. Eine später festgestellte Infektion mit Oxyuren schwächte die bereits abwehrgeschwächten Tiere zusätzlich und führte zur Unterbrechungen der Versuchsdurchführung. Aufgrund der dadurch erschwerten Bedingungen, der Komplexität des gesamten Versuchsaufbaus

und der langen Beobachtungszeiträume (bis zu 70 Tage pro Versuch) wurde auf weitere Versuche im Rahmen des vorliegenden Dissertationsprojekts verzichtet. Die Heterogenität der Ergebnisse nahm insgesamt über alle GvHD-Versuche hinweg zu, sodass unserer Arbeitsgruppe eine eindeutige signifikante Aussage zur Interaktion von NK-Zellen im Graft-versus-Host Mausmodell erst in späteren Versuchen gelang.

Meinhardt und Kröger *et al.* aus unserer Arbeitsgruppe untersuchten diesen Effekt weiter. Da die BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen nicht in Zellkultur eingesetzt werden konnten, wurden *in vivo* Versuche vorgenommen. Die *in vivo* Versuche wurde analog zum etablierten murinen allogenen Stammzelltransplantationsprotokoll durchgeführt. Anstelle von T-Zellen wurden dabei 1×10^6 NK-Zellen an Tag 1 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass ein Transfer von IL-2 stimulierten aufgereinigten CD27⁻CD11b⁺ NK-Zellen das BLI-Signal abschwächt und einen antileukämischen GvL-Effekt unterstützt. In der vorliegenden Arbeit gelang dies nur marginal bei diesem Versuch (dargestellt in Abbildung 16). Es wurde keine Ganzkörperbestrahlung und keine hämatopoetische Knochenmarktransplantation vorgenommen, sodass die Ergebnisse nur eingeschränkt vergleichbar sind. Die parallel auftretende GvHD wurde von Kröger und Meinhardt *et al.* im Rahmen der NK-Zelltherapie zusätzlich untersucht.

Die pathophysiologischen multifaktoriellen Ursachen einer GvHD-Erkrankung liegen in der Natur der allogenen Stammzelltransplantation. In Tiermodellen konnten bereits in den 1960 Jahren erste Erkenntnisse über den Ablauf und die Grundlagen einer GvHD erlangt werden [13]. Dabei ist die direkte akute und chronische Abstoßungsreaktion hauptsächlich T-Zell vermittelt [134]. Anschaulich demonstriert dies Abbildung 17. Für die Anwendung in der Klinik ist die Reduktion einer GvHD, bei gleichzeitig unverändertem GvL-Effekt wünschenswert. Erste Ergebnisse konnten diese Wirkung bei NK-Zellen in Studien bereits 2002 nachweisen [127]. Nach einer allogenen Transplantation migrieren T-Zellen und NK-Zellen gleichsinnig in ähnliche Organe und Gewebe. Spätere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe

demonstrieren, dass unreife CD117⁺ NK-Zellen eher in das Knochenmark migrieren. Dort proliferieren diese Zellen zwar, reifen aber nicht aus. Dagegen zeigen reife CD11b⁺ NK-Zellen eine ubiquitäre Migration in verschiedene Zielgewebe wie Blut, Lymphsystem, Milz und Lunge. In das Knochenmark dringen diese Zellen nur ganz vereinzelt [110]. Allogene IL-2 stimulierte Spender NK-Zellen können dabei nach allogener mismatch oder haploidentischer Transplantation im Tiermodell eine GvHD vermindern [6]. Dies ist hauptsächlich der CD27⁻CD11b⁺ NK-Zell-Subpopulation zu zuschreiben [110]. Besonders in der Anfangsphase einer GvHD reagieren NK-Zellen mit den allogenen Spender T-Zellen. Die allogenen Spender NK-Zellen scheinen zudem einen maßgeblichen Anti-Tumoreffekt aufzuweisen [116]. Frühe Ergebnisse in der humanmedizinischen Anwendung scheinen dies zu untermauern. Bei einer haploidentischen Transplantation kann ein KIR-Liganden mismatch (in Empfänger Richtung) zu einer geringeren Ausprägung einer GvHD führen. Postuliert wird von Giebel *et al.* eine stärkere NK-Zell-Alloreaktivität mit konsekutiv verstärkter GvL und indirekt verminderter GvHD-Induktion [63]. Allerdings werden diese Ergebnisse in der Wissenschaftsgemeinschaft der haploidentischen Transplantation heftig diskutiert, da auch gegensätzliche Daten publiziert sind [40].

Wie Meinhardt und Kröger *et al.* aus unserer Arbeitsgruppe in Fortsetzung der Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, können NK-Zellen nach der Transplantation einen GvL-Effekt unterstützen und gleichzeitig eine durch allogene DC induzierte Proliferation von T-Zellen hemmen. Dies ist hauptsächlich über die CD117⁻CD27⁻CD11b⁺ Subpopulation vermittelt [110]. Im Vergleich zur CD27⁺CD11b⁻ Subpopulation wird beim Einsatz von CD27⁻CD11b⁺ NK-Zellen entscheidend die T-Zell-Proliferation gestört und vermindert. Die CD27⁻CD11b⁺ NK-Zell-Subpopulation migriert sehr gut in Gewebe, welches beim Auftreten einer akuten GvHD eine Inflamationsreaktion durchläuft, wie die Lunge und den Gastrointestinaltrakt. Anschließend können die NK-Zellen eine GvHD-Reaktion vor Ort vermindern. Hierbei ist die Herunterregulation des Crosstalks zwischen DCs und zytotoxischen T-Zellen durch NK-Zellen von entscheidender Bedeutung. Eine weitere Proliferation der GvHD-

induzierenden-T-Zellen wird unterdrückt. Besonders konnte dies bei einer GvHD des Darms im Mausmodell demonstriert werden. Auf Rezeptorebene scheint besonders ein KIR mismatch eine Voraussetzung für eine Unterstützung des GvL-Effekts durch NK-Zellen zu sein [121].

Im Kontext der allogenen Transplantation wurde zusätzlich der adoptive Transfer von expandierten Spender NK-Zellen als Donor-Lymphozyten-Infusion (DLI) untersucht. NK-Zellen bilden beim Kontakt mit TLR-Liganden IFN- γ [53]. Dies scheint unter Zuhilfenahme von zusätzlichen Zellen effektiver zu verlaufen [113, 158]. Es ist davon auszugehen, dass dieser Mechanismus unter *in vivo* Bedingungen eher indirekt verläuft [62, 75, 159]. In der Interaktion mit dendritischen Zellen und weiteren APC-Zellen spielt dies in der GvHD ebenso eine Rolle. Im Großteil der Veröffentlichungen wird eine NK-Zell-Therapie stets als sicher und durchführbar eingestuft ohne größere unerwünschte Wirkungen im (kurzfristigen) Verlauf zu induzieren [126, 143]. Wie Meinhardt und Kröger *et al.* hier zeigten, war beim Auftreten einer GvHD die NK-Zell-Population verändert. Im Immunomonitoring war beim Neuauftreten der akuten Abstoßungsreaktion die murine (CD117⁻)CD27⁻CD11b⁺ NK-Zell-Subpopulation vermindert. Die Subpopulation im Menschen wäre analog die CD56^{dim}CD16^{high} Gruppe. In der Anwendung konnte gesehen werden, dass diese Subpopulation die längste Zeit zur Rekonstitution nach allogener Stammzelltransplantation benötigt [16, 18, 110]. Letztlich konnte durch diese weiterführenden Experimente in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass (CD117⁻)CD27⁻CD11b⁺ NK-Zellen scheinbar eine GvH-Reaktion im Empfänger durch vermehrte Apoptose der Spender DCs supprimieren und direkt einen GvL-Effekt induzieren und unterstützen.

In der humanmedizinischen Anwendung belegen erste Ergebnisse von prospektiven randomisierten Studien einen signifikanten Nutzen der NK-Zell-Therapie im Kontext der hämatopoetischen haploidentischen Stammzelltransplantation beim Menschen [143]. Diese Ergebnisse werden kontrovers diskutiert und es besteht weiterer Forschungsbedarf. Perspektivisch ist die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden

Rezeptoren für einen Therapieerfolg beim Einsatz von NK-Zellen wichtig. Ein pharmakologisches Ausschalten verschiedener Suppressoren kann zu einer höheren Elimination führen und die erwünschten Wirkungen begünstigen. Die Gesamtheit der aktivierenden und inhibierenden Signalwege, Signalstoffe, Kaskaden und der Rezeptoren ist noch nicht hinreichend erforscht. In der translationalen Anwendung ergibt sich zudem generell das angesprochene Problem der Konversion vom Mausmodell auf den Mensch. Heutzutage arbeiten viele Forschungsgruppen weltweit am Verständnis der Pathophysiologie, insbesondere einzelner NK-Zell-Rezeptoren sowie deren Kommunikation und Hierarchie. Diese Arbeiten werden voraussichtlich Möglichkeiten aufzeigen, manipulativ in die Signalkaskaden einzugreifen, um einen klinischen Benefit zu erzielen.

Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Arbeit konnte die neue Methode der Biolumineszenz Bildgebung inklusive eines neuen, selbstständig programmierten Auswertungsmoduls (Makro) etabliert und eingesetzt werden. Zudem wurde gemeinsam mit Dr. rer. nat. Irena Kröger und Dr. rer. nat. Kathrin Meinhardt ein Versuchsablauf zur Untersuchung des GvL-Effekts etabliert. Es wurden die Grundlagen erarbeitet, um NK-Zell-Subpopulationen im Kontext der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation weiter zu untersuchen. Dies ist besonders für eine Optimierung der NK-Zell-Therapien in der Humanmedizin von großer Bedeutung. Die im Rahmen dieser Untersuchungen gewonnenen Erkenntnisse tragen zum grundlegenden Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge im Verlauf der antileukämischen Effektor-Zell-Reaktion nach allogener Stammzelltransplantation bei.

Ergänzend zu bisherigen klinisch-experimentellen Ansätzen zur Verwendung IL-2 aktivierter NK-Zellen in der zellulären Tumorthherapie, sollten diese präklinischen Experimente die Eignung von IL-15 aktivierten NK-Zellen in der Tumorthherapie und Lymphom-Therapie testen. Vergleichend konnten die NK-Zellen dabei nach IL-15 Stimulation anhand der Expression der Oberflächenmarker CD27 und CD11b in drei NK-Zell-Subpopulationen unterteilt werden und mittels Durchflusszytometrie, ELISA und verschiedenen

Zellzytotoxischen Assays phänotypisch und funktionell weitergehend charakterisiert werden.

Stimulationsversuche mit IL-15 und einem neuen Medium, welches das Überleben fördert, könnten vielversprechend sein. Das geringe Überleben der NK-Zellen nach 24-stündiger IL-15 Stimulation (circa 21%), verglichen mit 71% Überleben nach 24-stündiger IL-2 Stimulation lässt eine vielleicht doch gesteigerte Zytotoxizität nach IL-15 Stimulation vermuten. Der Unterschied in der Zytolyse nach IL-2 (maximal 80% Lyse) oder IL-15 Stimulation (maximal 60% Lyse) fällt bezogen zur deutlich unterschiedlichen NK-Zell-Viabilität eher gering aus. Möglicherweise war jedoch die Dosierung des murinen IL-15 suboptimal. Vorversuche der Arbeitsgruppe unter Verwendung eines anderen Zellkultur-Mediums und mit niedrigeren Dosen IL-15 sind vielversprechend.

Anschaulich konnte demonstriert werden, dass allogene Immunzellen, vor allem T-Zellen, einen entscheidenden GvL-Effekt ausüben. Die maßgebliche Einschränkung auch in der klinischen Anwendung ist dabei die auftretende GvHD-Erkrankung. Hierbei ist den NK-Zellen eine protektive Rolle zuzuschreiben. Durch eine Weiterentwicklung des GvL-GvHD-Tiermodells konnte eine Verminderung einer GvHD-Reaktion durch die (CD117⁻)CD27⁻CD11b⁺ NK-Zell-Subpopulation demonstriert werden. Besonders die möglichen Zusammenhänge zwischen NK-Zell-Reifung und Auftreten einer GvHD zusammen mit dem Einfluss der NK-Zellen in der Immunrestitution nach allogener Stammzelltransplantation sind weiter zu untersuchen. Dabei ist auch der Biolumineszenz als nicht-invasives *in vivo* Verfahren ein hoher Stellenwert beizumessen. Ein neues hochauflösendes Biolumineszenz Gerät, wie das IVIS Spectrum von PerkinElmer, Waltham, MA, US, ermöglicht eine bessere Sensitivität, Quantifizierung und gegebenenfalls die Analyse einzelner Organe *ex vivo* am Ende eines Versuchs. Abbildung 20 zeigt einen Vergleich der Auflösungen und der Qualität der entstandenen Bilder.

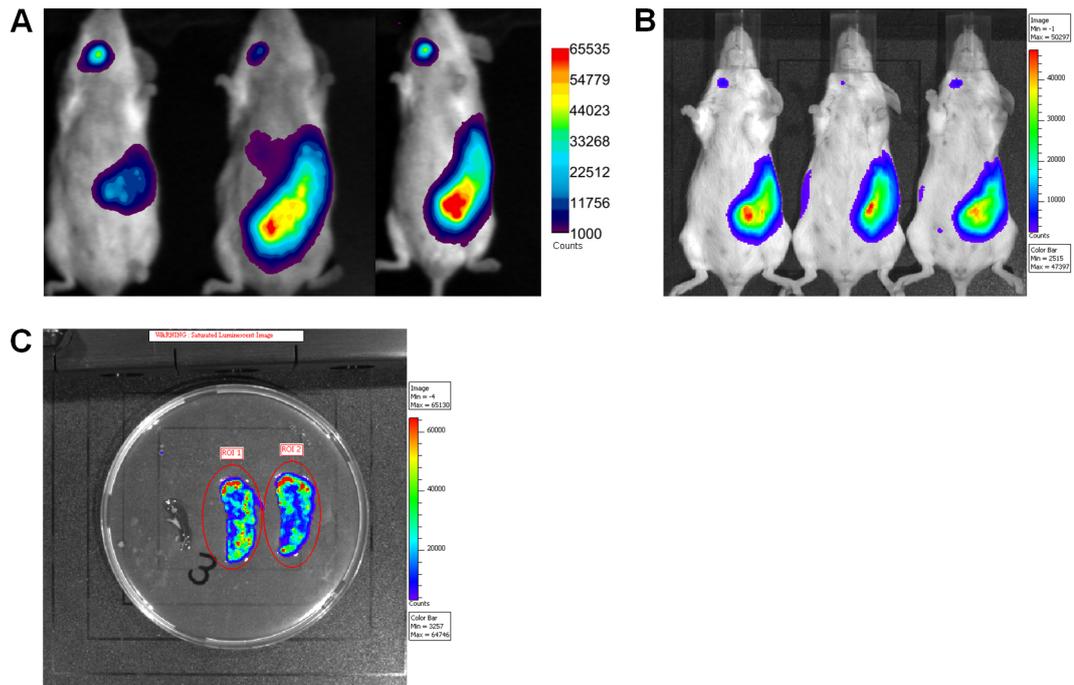


Abbildung 20: Ausblick

Allen Versuchstieren wurden in unterschiedlichen Experimenten aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Lymphomzellen aus unterschiedlichen Passagen und in unterschiedlicher Zellzahl injiziert. 3 Mäuse erhielten $0,2 \cdot 10^6$ aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 8 pro Maus und wurden im bisherigen CCD-Kamerasystem #C4742-98, Hamamatsu Photonics, Okayama City, JP analysiert (A). 3 Mäusen erhielten $0,2 \cdot 10^6$ aufgetaute BCL-1-Luc⁺gfp⁺-Zellen der Passage 9 pro Maus und wurden im CCD-Kamerasystem IVIS Spectrum®, Caliper Life Science (jetzt PerkinElmer), Waltham, MA, US analysiert (B). Zusätzlich wurden bei 2 Mäusen jeweils die Milz *ex vivo* gemessen (C). Die Auswertung erfolgte jeweils anhand einer linearen Farbskala mit der Einheit Counts.

Bereits laufende weitere Versuche in der Arbeitsgruppe sind vielversprechend.

Vor allem in Kooperation der Lebenswissenschaften, von den molekularen biologischen Mechanismen bis hin zur Anwendung im Tiermodell oder in klinischen Studien, kann ein erheblicher Erkenntnisgewinn generiert und der klinische Einsatz von NK-Zellen gefördert werden. Das Zeitalter der translationalen Forschung und Anwendung hat begonnen und birgt ein enormes Potential.

7 Publikation

Meinhardt K, Kroeger I, Bauer R, Ganss F, Ovsy I, Rothamer J, Büttner M, Atreya I, Waldner M, Bittrich M, Lehmann CH, Rieger MA, Beilhack A, Zeiser R, Edinger M, Dudziak D, Mackensen A, Rehli M, Ullrich E. (2015) Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects. *Oncoimmunology*. 4(1):e981483.

8 Literaturverzeichnis

- [1] Adams EJ, Juo ZS, Venook RT, Boulanger MJ, Arase H, Lanier LL, Garcia KC. (2007) Structural elucidation of the m157 mouse cytomegalovirus ligand for Ly49 natural killer cell receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(24):10128-10133.
- [2] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of immunological methods*. 294(1-2):15-22.
- [3] Anderson RS. (1935) Studies on Bioluminescence : li. The Partial Purification of Cypridina Luciferin. *The Journal of general physiology*. 19(2):301-305.
- [4] Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetynck S, Stewart CA, Bresciani V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagne F, Ugolini S, Vivier E. (2006) Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 25(2):331-342.
- [5] Arase H, Mocarski ES, Campbell AE, Hill AB, Lanier LL. (2002) Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*. 296(5571):1323-1326.
- [6] Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, Murphy WJ. (1998) Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of clinical investigation*. 101(9):1835-1842.
- [7] Attallah AM, Lewis FA, Urritia-Shaw A, Folks T, Yeatman TJ. (1980) Natural killer cells (NK) and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity

(ADCC) components of *Schistosoma mansoni* infection. *International archives of allergy and applied immunology*. 63(3):351-354.

[8] Auletta JJ, Lazarus HM. (2005) Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone marrow transplantation*. 35(9):835-857.

[9] Baggiolini M, Dewald B, Moser B. (1997) Human chemokines: an update. *Annual review of immunology*. 15:675-705.

[10] Barao I, Hudig D, Ascensao JL. (2003) IL-15-mediated induction of LFA-1 is a late step required for cytotoxic differentiation of human NK cells from CD34+Lin- bone marrow cells. *Journal of immunology*. 171(2):683-690.

[11] Baume DM, Caligiuri MA, Manley TJ, Daley JF, Ritz J. (1990) Differential expression of CD8 alpha and CD8 beta associated with MHC-restricted and non-MHC-restricted cytolytic effector cells. *Cellular immunology*. 131(2):352-365.

[12] Biassoni R, Cantoni C, Pende D, Sivori S, Parolini S, Vitale M, Bottino C, Moretta A. (2001) Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunological reviews*. 181:203-214.

[13] Billingham RE. (1966) The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey lectures*. 62:21-78.

[14] Biron CA, Byron KS, Sullivan JL. (1989) Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells. *The New England journal of medicine*. 320(26):1731-1735.

[15] Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annual review of immunology*. 17:189-220.

[16] Bjorkstrom NK, Riese P, Heuts F, Andersson S, Fauriat C, Ivarsson MA, Bjorklund AT, Flodstrom-Tullberg M, Michaelsson J, Rottenberg ME, Guzman CA, Ljunggren HG, Malmberg KJ. (2010) Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*. 116(19):3853-3864.

[17] Bluman EM, Bartynski KJ, Avalos BR, Caligiuri MA. (1996) Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *The Journal of clinical investigation*. 97(12):2722-2727.

- [18] Bosch M, Dhadda M, Hoegh-Petersen M, Liu Y, Hagel LM, Podgorny P, Ugarte-Torres A, Khan FM, Luidier J, Auer-Grzesiak I, Mansoor A, Russell JA, Daly A, Stewart DA, Maloney D, Boeckh M, Storek J. (2012) Immune reconstitution after anti-thymocyte globulin-conditioned hematopoietic cell transplantation. *Cytotherapy*. 14(10):1258-1275.
- [19] Brady J, Hayakawa Y, Smyth MJ, Nutt SL. (2004) IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *Journal of immunology*. 172(4):2048-2058.
- [20] Bubic I, Wagner M, Krmpotic A, Saulig T, Kim S, Yokoyama WM, Jonjic S, Koszinowski UH. (2004) Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *Journal of virology*. 78(14):7536-7544.
- [21] Burnet FM. (1970) The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research*. 13:1-27.
- [22] Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends in cell biology*. 9(12):M57-60.
- [23] Cannon JP, Haire RN, Rast JP, Litman GW. (2004) The phylogenetic origins of the antigen-binding receptors and somatic diversification mechanisms. *Immunological reviews*. 200:12-22.
- [24] Carayannopoulos LN, Yokoyama WM. (2004) Recognition of infected cells by natural killer cells. *Current opinion in immunology*. 16(1):26-33.
- [25] Catalfamo M, Henkart PA. (2003) Perforin and the granule exocytosis cytotoxicity pathway. *Current opinion in immunology*. 15(5):522-527.
- [26] Cederbrant K, Marcusson-Stahl M, Condevaux F, Descotes J. (2003) NK-cell activity in immunotoxicity drug evaluation. *Toxicology*. 185(3):241-250.
- [27] Chang YJ, Zhao XY, Huang XJ. (2014) Immune reconstitution after haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. 20(4):440-449.
- [28] Chenoweth MJ, Mian MF, Barra NG, Alain T, Sonenberg N, Bramson J, Lichty BD, Richards CD, Ma A, Ashkar AA. (2012) IL-15 can signal via IL-15R α , JNK, and NF- κ B to drive RANTES production by myeloid cells. *Journal of immunology*. 188(9):4149-4157.

- [29] Chiossone L, Chaix J, Fuseri N, Roth C, Vivier E, Walzer T. (2009) Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*. 113(22):5488-5496.
- [30] Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. (2003) What does it take to make a natural killer? *Nature reviews Immunology*. 3(5):413-425.
- [31] Colucci F, Di Santo JP. (2000) The receptor tyrosine kinase c-kit provides a critical signal for survival, expansion, and maturation of mouse natural killer cells. *Blood*. 95(3):984-991.
- [32] Contag CH, Contag PR, Mullins JI, Spilman SD, Stevenson DK, Benaron DA. (1995) Photonic detection of bacterial pathogens in living hosts. *Molecular microbiology*. 18(4):593-603.
- [33] Contag CH, Spilman SD, Contag PR, Oshiro M, Eames B, Dennerly P, Stevenson DK, Benaron DA. (1997) Visualizing gene expression in living mammals using a bioluminescent reporter. *Photochemistry and photobiology*. 66(4):523-531.
- [34] Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM, Ferrara JL. (1996) An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood*. 88(8):3230-3239.
- [35] Cooper MA, Elliott JM, Keyel PA, Yang L, Carrero JA, Yokoyama WM. (2009) Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(6):1915-1919.
- [36] Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology*. 22(11):633-640.
- [37] Cormier MJ, Lee J, Wampler JE. (1975) Bioluminescence: recent advances. *Annual review of biochemistry*. 44:255-272.
- [38] Cousens LP, Orange JS, Su HC, Biron CA. (1997) Interferon-alpha/beta inhibition of interleukin 12 and interferon-gamma production in vitro and endogenously during viral infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(2):634-639.
- [39] Cui K, Xu X, Zhao H, Wong ST. (2008) A quantitative study of factors affecting in vivo bioluminescence imaging. *Luminescence : the journal of biological and chemical luminescence*. 23(5):292-295.

- [40] Davies SM, Ruggieri L, DeFor T, Wagner JE, Weisdorf DJ, Miller JS, Velardi A, Blazar BR. (2002) Evaluation of KIR ligand incompatibility in mismatched unrelated donor hematopoietic transplants. Killer immunoglobulin-like receptor. *Blood*. 100(10):3825-3827.
- [41] De Colvenaer V, Taveirne S, Delforche M, De Smedt M, Vandekerckhove B, Taghon T, Boon L, Plum J, Leclercq G. (2011) CD27-deficient mice show normal NK-cell differentiation but impaired function upon stimulation. *Immunology and cell biology*. 89(7):803-811.
- [42] DeLuca M, Dempsey ME, Hori K, Cormier MJ. (1976) Source of oxygen in the CO₂ produced during chemiluminescence of firefly luciferyl-adenylate and Renilla luciferin. *Biochemical and biophysical research communications*. 69(1):262-267.
- [43] Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. (2000) Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nature immunology*. 1(2):119-126.
- [44] Djeu JY, Huang KY, Herberman RB. (1980) Augmentation of mouse natural killer activity and induction of interferon by tumor cells in vivo. *The Journal of experimental medicine*. 151(4):781-789.
- [45] Dokun AO, Kim S, Smith HR, Kang HS, Chu DT, Yokoyama WM. (2001) Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nature immunology*. 2(10):951-956.
- [46] Domzig W, Stadler BM, Herberman RB. (1983) Interleukin 2 dependence of human natural killer (NK) cell activity. *J Immunol*. 130(4):1970-1973.
- [47] Duluc D, Tan F, Scotet M, Blanchard S, Fremaux I, Garo E, Horvat B, Eid P, Delneste Y, Jeannin P. (2009) PolyI:C plus IL-2 or IL-12 induce IFN- γ production by human NK cells via autocrine IFN- β . *European journal of immunology*. 39(10):2877-2884.
- [48] Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology*. 3(11):991-998.
- [49] Dunne J, Lynch S, O'Farrelly C, Todryk S, Hegarty JE, Feighery C, Doherty DG. (2001) Selective expansion and partial activation of human NK

cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *Journal of immunology*. 167(6):3129-3138.

[50] Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, Negrin RS. (2003) CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med*. 9(9):1144-1150.

[51] Elpek KG, Rubinstein MP, Bellemare-Pelletier A, Goldrath AW, Turley SJ. (2010) Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15Ralpha complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(50):21647-21652.

[52] Fehniger TA, Wylie T, Germino E, Leong JW, Magrini VJ, Koul S, Keppel CR, Schneider SE, Koboldt DC, Sullivan RP, Heinz ME, Crosby SD, Nagarajan R, Ramsingh G, Link DC, Ley TJ, Mardis ER. (2010) Next-generation sequencing identifies the natural killer cell microRNA transcriptome. *Genome research*. 20(11):1590-1604.

[53] Ferlazzo G, Munz C. (2004) NK cell compartments and their activation by dendritic cells. *Journal of immunology*. 172(3):1333-1339.

[54] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. (2002) Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *The Journal of experimental medicine*. 195(3):343-351.

[55] Fernandez NC, Treiner E, Vance RE, Jamieson AM, Lemieux S, Raulet DH. (2005) A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*. 105(11):4416-4423.

[56] Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. (1996) The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem cells*. 14(5):473-489.

[57] Fischer K, Mackensen A. (2003) The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. *Methods*. 31(2):135-142.

[58] Flajnik MF, Du Pasquier L. (2004) Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line? *Trends in immunology*. 25(12):640-644.

- [59] Fujisaki H, Kakuda H, Shimasaki N, Imai C, Ma J, Lockey T, Eldridge P, Leung WH, Campana D. (2009) Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer research*. 69(9):4010-4017.
- [60] Garg TK, Szmania SM, Khan JA, Hoering A, Malbrough PA, Moreno-Bost A, Greenway AD, Lingo JD, Li X, Yaccoby S, Suva LJ, Storrie B, Tricot G, Campana D, Shaughnessy JD, Jr., Nair BP, Bellamy WT, Epstein J, Barlogie B, van Rhee F. (2012) Highly activated and expanded natural killer cells for multiple myeloma immunotherapy. *Haematologica*. 97(9):1348-1356.
- [61] Geisler K, Reischer A, Kroeger I, Jacobs B, Meinhardt K, Bauer R, Ryffel B, Mackensen A, Ullrich E. (2014) Nilotinib combined with interleukin-2 mediates antitumor and immunological effects in a B16 melanoma model. *Oncology reports*. 31(5):2015-2020.
- [62] Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G. (2005) The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *Journal of immunology*. 174(2):727-734.
- [63] Giebel S, Locatelli F, Lamparelli T, Velardi A, Davies S, Frumento G, Maccario R, Bonetti F, Wojnar J, Martinetti M, Frassoni F, Giorgiani G, Bacigalupo A, Holowiecki J. (2003) Survival advantage with KIR ligand incompatibility in hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors. *Blood*. 102(3):814-819.
- [64] Gordy LE, Bezbradica JS, Flyak AI, Spencer CT, Dunkle A, Sun J, Stanic AK, Boothby MR, He YW, Zhao Z, Van Kaer L, Joyce S. (2011) IL-15 regulates homeostasis and terminal maturation of NKT cells. *Journal of immunology*. 187(12):6335-6345.
- [65] Guma M, Angulo A, Vilches C, Gomez-Lozano N, Malats N, Lopez-Botet M. (2004) Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*. 104(12):3664-3671.
- [66] Guma M, Budt M, Saez A, Brckalo T, Hengel H, Angulo A, Lopez-Botet M. (2006) Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*. 107(9):3624-3631.
- [67] Guma M, Cabrera C, Erkizia I, Bofill M, Clotet B, Ruiz L, Lopez-Botet M. (2006) Human cytomegalovirus infection is associated with increased

proportions of NK cells that express the CD94/NKG2C receptor in aviremic HIV-1-positive patients. *The Journal of infectious diseases*. 194(1):38-41.

[68] Handa K, Suzuki R, Matsui H, Shimizu Y, Kumagai K. (1983) Natural killer (NK) cells as a responder to interleukin 2 (IL 2). II. IL 2-induced interferon gamma production. *Journal of immunology*. 130(2):988-992.

[69] Hanna J, Bechtel P, Zhai Y, Youssef F, McLachlan K, Mandelboim O. (2004) Novel insights on human NK cells' immunological modalities revealed by gene expression profiling. *Journal of immunology*. 173(11):6547-6563.

[70] Hanna J, Gonen-Gross T, Fitchett J, Rowe T, Daniels M, Arnon TI, Gazit R, Joseph A, Schjetne KW, Steinle A, Porgador A, Mevorach D, Goldman-Wohl D, Yagel S, LaBarre MJ, Buckner JH, Mandelboim O. (2004) Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *The Journal of clinical investigation*. 114(11):1612-1623.

[71] Hansson M, Karre K, Kiessling R, Roder J, Andersson B, Hayry P. (1979) Natural NK-cell targets in the mouse thymus: characteristics of the sensitive cell population. *Journal of immunology*. 123(2):765-771.

[72] Harada H, Suzu S, Ito T, Okada S. (2005) Selective expansion and engraftment of human CD16+ NK cells in NOD/SCID mice. *European journal of immunology*. 35(12):3599-3609.

[73] Harada Y, Imataki O, Heike Y, Kawai H, Shimosaka A, Mori S, Kami M, Tanosaki R, Ikarashi Y, Iizuka A, Yoshida M, Wakasugi H, Saito S, Takaue Y, Takei M, Kakizoe T. (2005) Expansion of alpha-galactosylceramide-stimulated Valpha24+ NKT cells cultured in the absence of animal materials. *Journal of immunotherapy*. 28(4):314-321.

[74] Hardy J, Edinger M, Bachmann MH, Negrin RS, Fathman CG, Contag CH. (2001) Bioluminescence imaging of lymphocyte trafficking in vivo. *Experimental hematology*. 29(12):1353-1360.

[75] Hart OM, Athie-Morales V, O'Connor GM, Gardiner CM. (2005) TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production. *Journal of immunology*. 175(3):1636-1642.

[76] Harty JT, Badovinac VP. (2008) Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nature reviews Immunology*. 8(2):107-119.

- [77] Hauser A, Schratlbauer K, Najdanovic D, Schlossnickel R, Koch A, Hejtman M, Krugluger W. (2013) Optimized quantification of lymphocyte subsets by use of CD7 and CD33. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 83(3):316-323.
- [78] Hayakawa Y, Smyth MJ. (2006) CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *Journal of immunology*. 176(3):1517-1524.
- [79] Herberman RB, Nunn ME, Holden HT, Lavrin DH. (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 16(2):230-239.
- [80] Hoffmann P, Edinger M. (2006) CD4+CD25+ regulatory T cells and graft-versus-host disease. *Semin Hematol*. 43(1):62-69.
- [81] Hoglund P, Brodin P. (2010) Current perspectives of natural killer cell education by MHC class I molecules. *Nature reviews Immunology*. 10(10):724-734.
- [82] Jamieson AM, Isnard P, Dorfman JR, Coles MC, Raulet DH. (2004) Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *Journal of immunology*. 172(2):864-870.
- [83] Kaech SM, Hemby S, Kersh E, Ahmed R. (2002) Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell*. 111(6):837-851.
- [84] Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. (1994) Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*. 369(6475):31-37.
- [85] Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature*. 319(6055):675-678.
- [86] Kasahara M, Suzuki T, Pasquier LD. (2004) On the origins of the adaptive immune system: novel insights from invertebrates and cold-blooded vertebrates. *Trends in immunology*. 25(2):105-111.
- [87] Kaufmann SH. (1999) Cell-mediated immunity: dealing a direct blow to pathogens. *Current biology : CB*. 9(3):R97-99.

- [88] Kawamura T, Koka R, Ma A, Kumar V. (2003) Differential roles for IL-15R alpha-chain in NK cell development and Ly-49 induction. *Journal of immunology*. 171(10):5085-5090.
- [89] Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. (1975) "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European journal of immunology*. 5(2):117-121.
- [90] Kiessling R, Klein E, Wigzell H. (1975) "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European journal of immunology*. 5(2):112-117.
- [91] Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song YJ, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, Yokoyama WM. (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*. 436(7051):709-713.
- [92] Kim YB, Huh ND, Koren HS, Amos DB. (1980) Natural killing (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in specific pathogen-free (SPF) miniature swine and germfree piglets. I. Comparison of NK and ADCC. *Journal of immunology*. 125(2):755-762.
- [93] Koehl U, Esser R, Zimmermann S, Tonn T, Kotchetkov R, Bartling T, Sorensen J, Gruttner HP, Bader P, Seifried E, Martin H, Lang P, Passweg JR, Klingebiel T, Schwabe D. (2005) Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children. *Klinische Padiatrie*. 217(6):345-350.
- [94] Koka R, Burkett P, Chien M, Chai S, Boone DL, Ma A. (2004) Cutting edge: murine dendritic cells require IL-15R alpha to prime NK cells. *Journal of immunology*. 173(6):3594-3598.
- [95] Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. (2008) Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*. 112(3):914-915.
- [96] Kumar V, McNerney ME. (2005) A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance. *Nature reviews Immunology*. 5(5):363-374.
- [97] Lanier LL. (2007) Back to the future--defining NK cells and T cells. *European journal of immunology*. 37(6):1424-1426.

- [98] Lanier LL. (2005) NK cell recognition. *Annual review of immunology*. 23:225-274.
- [99] Lanier LL, Phillips JH, Hackett J, Jr., Tutt M, Kumar V. (1986) Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *Journal of immunology*. 137(9):2735-2739.
- [100] Lauwerys BR, Garot N, Renauld JC, Houssiau FA. (2000) Cytokine production and killer activity of NK/T-NK cells derived with IL-2, IL-15, or the combination of IL-12 and IL-18. *Journal of immunology*. 165(4):1847-1853.
- [101] Lauzon NM, Mian F, MacKenzie R, Ashkar AA. (2006) The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. *Cellular immunology*. 241(2):102-112.
- [102] Lima M, Almeida J, dos Anjos Teixeira M, Queiros ML, Justica B, Orfao A. (2002) The "ex vivo" patterns of CD2/CD7, CD57/CD11c, CD38/CD11b, CD45RA/CD45RO, and CD11a/HLA-DR expression identify acute/early and chronic/late NK-cell activation states. *Blood cells, molecules & diseases*. 28(2):181-190.
- [103] Ljunggren HG, Karre K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*. 11(7):237-244.
- [104] Mandl SJ, Mari C, Edinger M, Negrin RS, Tait JF, Contag CH, Blankenberg FG. (2004) Multi-modality imaging identifies key times for annexin V imaging as an early predictor of therapeutic outcome. *Mol Imaging*. 3(1):1-8.
- [105] Marcais A, Viel S, Grau M, Henry T, Marvel J, Walzer T. (2013) Regulation of mouse NK cell development and function by cytokines. *Frontiers in immunology*. 4:450.
- [106] Mason LH, Anderson SK, Yokoyama WM, Smith HR, Winkler-Pickett R, Ortaldo JR. (1996) The Ly-49D receptor activates murine natural killer cells. *The Journal of experimental medicine*. 184(6):2119-2128.
- [107] McElroy WD, Ballentine R. (1944) The Mechanism of Bioluminescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 30(12):377-382.
- [108] Meazza R, Azzarone B, Orengo AM, Ferrini S. (2011) Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function:

perspectives for immunotherapy. *Journal of biomedicine & biotechnology*. 2011:861920.

[109] Meinhardt K, Kroeger I, Abendroth A, Muller S, Mackensen A, Ullrich E. (2012) Influence of NK cell magnetic bead isolation methods on phenotype and function of murine NK cells. *Journal of immunological methods*. 378(1-2):1-10.

[110] Meinhardt K, Kroeger I, Bauer R, Ganss F, Ovsy I, Rothamer J, Buttner M, Atreya I, Waldner M, Bittrich M, Lehmann CH, Rieger MA, Beilhack A, Zeiser R, Edinger M, Dudziak D, Mackensen A, Rehli M, Ullrich E. (2015) Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft--leukemia- and reducing graft--host-effects. *Oncoimmunology*. 4(1):e981483.

[111] Middleton D, Curran M, Maxwell L. (2002) Natural killer cells and their receptors. *Transplant immunology*. 10(2-3):147-164.

[112] Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, Orchard PJ, Blazar BR, Wagner JE, Slungaard A, Weisdorf DJ, Okazaki IJ, McGlave PB. (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*. 105(8):3051-3057.

[113] Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. (2002) What is a natural killer cell? *Nature immunology*. 3(1):6-8.

[114] Nogusa S, Murasko DM, Gardner EM. (2012) Differential effects of stimulatory factors on natural killer cell activities of young and aged mice. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences*. 67(9):947-954.

[115] O'Leary JG, Goodarzi M, Drayton DL, von Andrian UH. (2006) T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nature immunology*. 7(5):507-516.

[116] Olson JA, Leveson-Gower DB, Gill S, Baker J, Beilhack A, Negrin RS. (2010) NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*. 115(21):4293-4301.

[117] Orange JS. (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature reviews Immunology*. 8(9):713-725.

- [118] Orange JS, Ballas ZK. (2006) Natural killer cells in human health and disease. *Clinical immunology*. 118(1):1-10.
- [119] Orange JS, Biron CA. (1996) Characterization of early IL-12, IFN- α , and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection. *Journal of immunology*. 156(12):4746-4756.
- [120] Paul WE. *Fundamental Immunology*. Sixth. 2003.
- [121] Pegram HJ, Ritchie DS, Smyth MJ, Wiernik A, Prince HM, Darcy PK, Kershaw MH. (2011) Alloreactive natural killer cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Leukemia research*. 35(1):14-21.
- [122] Raulet DH. (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nature immunology*. 5(10):996-1002.
- [123] Riccardi C, Giampietri A, Migliorati G, Cannarile L, D'Adamio L, Herberman RB. (1986) Generation of mouse natural killer (NK) cell activity: effect of interleukin-2 (IL-2) and interferon (IFN) on the in vivo development of natural killer cells from bone marrow (BM) progenitor cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 38(4):553-562.
- [124] Rice BW, Cable MD, Nelson MB. (2001) In vivo imaging of light-emitting probes. *Journal of biomedical optics*. 6(4):432-440.
- [125] Robertson MJ, Ritz J. (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 76(12):2421-2438.
- [126] Rubnitz JE, Inaba H, Ribeiro RC, Pounds S, Rooney B, Bell T, Pui CH, Leung W. (2010) NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 28(6):955-959.
- [127] Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, Martelli MF, Velardi A. (2002) Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*. 295(5562):2097-2100.
- [128] Saksela E. (1980) [Interferon and natural killer cells]. *Duodecim; laaketieteellinen aikakauskirja*. 96(16):1061-1064.

- [129] Schoenborn JR, Wilson CB. (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Advances in immunology*. 96:41-101.
- [130] Schonberg K, Rudolph J, Vonnahme M, Parampalli Yajnanarayana S, Cornez I, Hejazi M, Manser AR, Uhrberg M, Verbeek W, Koschmieder S, Brummendorf TH, Brossart P, Heine A, Wolf D. (2015) JAK Inhibition Impairs NK Cell Function in Myeloproliferative Neoplasms. *Cancer research*. 75(11):2187-2199.
- [131] Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. (2011) Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 331(6024):1565-1570.
- [132] Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. (2004) Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology*. 75(2):163-189.
- [133] Senju M, Makiyama K, Hara K, Hulstaert F, Lowder JN, Jewell DP. (1991) Two-color immunofluorescence and flow cytometric analysis of peripheral blood lymphocyte subsets in Caucasian and Japanese healthy subjects. *Japanese journal of medicine*. 30(6):509-515.
- [134] Shlomchik WD. (2007) Graft-versus-host disease. *Nature reviews Immunology*. 7(5):340-352.
- [135] Si L, Whiteside TL. (1983) Tissue distribution of human NK cells studied with anti-Leu-7 monoclonal antibody. *Journal of immunology*. 130(5):2149-2155.
- [136] Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L, Moretta A. (2004) CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(27):10116-10121.
- [137] Smith HR, Heusel JW, Mehta IK, Kim S, Dorner BG, Naidenko OV, Iizuka K, Furukawa H, Beckman DL, Pingel JT, Scalzo AA, Fremont DH, Yokoyama WM. (2002) Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 99(13):8826-8831.

- [138] Smith KM, Wu J, Bakker AB, Phillips JH, Lanier LL. (1998) Ly-49D and Ly-49H associate with mouse DAP12 and form activating receptors. *Journal of immunology*. 161(1):7-10.
- [139] Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. (2005) Activation of NK cell cytotoxicity. *Molecular immunology*. 42(4):501-510.
- [140] Son CH, Keum JH, Yang K, Nam J, Kim MJ, Kim SH, Kang CD, Oh SO, Kim CD, Park YS, Bae J. (2014) Synergistic enhancement of NK cell-mediated cytotoxicity by combination of histone deacetylase inhibitor and ionizing radiation. *Radiation oncology*. 9:49.
- [141] Sprent J, Surh CD. (2002) T cell memory. *Annual review of immunology*. 20:551-579.
- [142] Stepp SE, Mathew PA, Bennett M, de Saint Basile G, Kumar V. (2000) Perforin: more than just an effector molecule. *Immunology today*. 21(6):254-256.
- [143] Stern M, Passweg JR, Meyer-Monard S, Esser R, Tonn T, Soerensen J, Paulussen M, Gratwohl A, Klingebiel T, Bader P, Tichelli A, Schwabe D, Koehl U. (2013) Pre-emptive immunotherapy with purified natural killer cells after haploidentical SCT: a prospective phase II study in two centers. *Bone marrow transplantation*. 48(3):433-438.
- [144] Stern P, Gidlund M, Orn A, Wigzell H. (1980) Natural killer cells mediate lysis of embryonal carcinoma cells lacking MHC. *Nature*. 285(5763):341-342.
- [145] Stewart CA, Vivier E, Colonna M. (2006) Strategies of natural killer cell recognition and signaling. *Current topics in microbiology and immunology*. 298:1-21.
- [146] Sun JC, Beilke JN, Lanier LL. (2009) Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*. 457(7229):557-561.
- [147] Sun JC, Lanier LL. (2009) Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity? *European journal of immunology*. 39(8):2059-2064.
- [148] Sun JC, Lanier LL. (2008) Tolerance of NK cells encountering their viral ligand during development. *The Journal of experimental medicine*. 205(8):1819-1828.

- [149] Teshima T, Ordemann R, Reddy P, Gagin S, Liu C, Cooke KR, Ferrara JL. (2002) Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nature medicine*. 8(6):575-581.
- [150] Thompson CB. (1995) New insights into V(D)J recombination and its role in the evolution of the immune system. *Immunity*. 3(5):531-539.
- [151] Todd DJ, Greiner DL, Rossini AA, Mordes JP, Bortell R. (2001) An atypical population of NK cells that spontaneously secrete IFN-gamma and IL-4 is present in the intraepithelial lymphoid compartment of the rat. *Journal of immunology*. 167(7):3600-3609.
- [152] Trinchieri G. (1989) Biology of natural killer cells. *Advances in immunology*. 47:187-376.
- [153] Trinchieri G. (1995) Natural killer cells wear different hats: effector cells of innate resistance and regulatory cells of adaptive immunity and of hematopoiesis. *Seminars in immunology*. 7(2):83-88.
- [154] Trinchieri G, Santoli D. (1978) Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *The Journal of experimental medicine*. 147(5):1314-1333.
- [155] Trinchieri G, Santoli D, Dee RR, Knowles BB. (1978) Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Identification of the anti-viral activity as interferon and characterization of the human effector lymphocyte subpopulation. *The Journal of experimental medicine*. 147(5):1299-1313.
- [156] Tripathy SK, Keyel PA, Yang L, Pingel JT, Cheng TP, Schneeberger A, Yokoyama WM. (2008) Continuous engagement of a self-specific activation receptor induces NK cell tolerance. *The Journal of experimental medicine*. 205(8):1829-1841.
- [157] Vilches C, Parham P. (2002) KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual review of immunology*. 20:217-251.
- [158] Vivier E, Biron CA. (2002) Immunology. A pathogen receptor on natural killer cells. *Science*. 296(5571):1248-1249.
- [159] Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 9(5):503-510.

- [160] Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM, Baars PA, Gent MR, Leclercq G, Hamann J, Kuijpers TW, van Lier RA. (2008) CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *Journal of immunology*. 180(6):3739-3745.
- [161] Waldmann T, Tagaya Y, Bamford R. (1998) Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors. *International reviews of immunology*. 16(3-4):205-226.
- [162] Waldmann TA. (2013) The biology of IL-15: implications for cancer therapy and the treatment of autoimmune disorders. *The journal of investigative dermatology Symposium proceedings / the Society for Investigative Dermatology, Inc [and] European Society for Dermatological Research*. 16(1):S28-30.
- [163] Walzer T, Blery M, Chaix J, Fuseri N, Chasson L, Robbins SH, Jaeger S, Andre P, Gauthier L, Daniel L, Chemin K, Morel Y, Dalod M, Imbert J, Pierres M, Moretta A, Romagne F, Vivier E. (2007) Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(9):3384-3389.
- [164] Warnke RA, Slavin S, Coffman RL, Butcher EC, Knapp MR, Strober S, Weißman IL. (1979) The pathology and homing of a transplantable murine B cell leukemia (BCL1). *Journal of immunology*. 123(3):1181-1188.
- [165] Williams MA, Bevan MJ. (2007) Effector and memory CTL differentiation. *Annual review of immunology*. 25:171-192.
- [166] Yamagata T, Benoist C, Mathis D. (2006) A shared gene-expression signature in innate-like lymphocytes. *Immunological reviews*. 210:52-66.
- [167] Yokoyama WM. *Natural Killer Cells (Kapitel 17)*. *Fundamental Immunology*. Aufl. Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
- [168] Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES, Perussia B. (1998) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *The Journal of experimental medicine*. 188(12):2375-2380.
- [169] Zhang Y, Wallace DL, de Lara CM, Ghattas H, Asquith B, Worth A, Griffin GE, Taylor GP, Tough DF, Beverley PC, Macallan DC. (2007) In vivo

kinetics of human natural killer cells: the effects of ageing and acute and chronic viral infection. *Immunology*. 121(2):258-265.

[170] Zhu S, Denman CJ, Cobanoglu ZS, Kiany S, Lau CC, Gottschalk SM, Hughes DP, Kleinerman ES, Lee DA. (2015) The narrow-spectrum HDAC inhibitor entinostat enhances NKG2D expression without NK cell toxicity, leading to enhanced recognition of cancer cells. *Pharmaceutical research*. 32(3):779-792

9 Abkürzungsverzeichnis

7AAD	7-Aminoactinomycin D
ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat + EDTA
ADCC	Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität
AK	Antikörper
AnxV	Annexin-V
APC	Allophycocyanin
APC	antigenpräsentierende Zellen
B16F10	Wildtyp B16 Melanom Tumor-Zelllinie
BCL-1	B cell lymphoma line 1
CBMC	cord blood mononuclear cells
CD	Cluster of Differentiation
d	days / Tage
DC	dendritische Zellen
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DN	doppelt negative Subpopulation
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DP	doppelt positive Subpopulation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluoreszenz activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forward scatter / Vorwärtslichtstrahl
gfp ⁺	green fluorescent protein, Grün-fluoreszierendes-Protein
h	hours / Stunden
HCMV	humaner Zytomegalievirus
HDAC	Histon-Deacetylase Inhibitoren
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
ITIM	cytoplasmic immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

KIR	killer cell inhibitory receptor
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharid
Luc ⁺	Luziferase exprimierend
Ly49	Aktivierungsrezeptor auf NK-Zellen
MACS®	Magnetic cell separation
MCMV	muriner Zytomegalievirus
MHC	major histocompatibility complex, humanes Leukozytenantigen-System (HLA)
NCAM	neural cell adhesion molecule
NK	Natürliche Killer-Zellen
NKG2D	Natural-killer group 2D
NKG2DL	NKG2D Ligand
NK-Zelle	Natürliche Killer Zelle
NOD	Non-Obese Diabetic
ns	nicht signifikant
PAMP	Pathogen assoziierte molekulare Strukturen
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin chlorophyll protein
RAG1	Mäuse ohne T- und B-Lymphozyten, aber mit NK-Zellen
RAG2	Mäuse ohne T- und B-Lymphozyten, ohne NK-Zellen
rpm	rounds per minute
s.c.	subkutan
SCF	Stammzellfaktor
SCID	Severe combined immunodeficient disease, schwere Immundefizienz
SCT	stem cell transplantation
SSC	Sideward scatter / Seitwärtslichtstreuung
SZT	Stammzelltransplantation
TCR	T-Zell-Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing Ligand

T _{reg}	regulatorische T-Zellen
UCB	umbilical cord blood, Nabelschnurblut

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Evelyn Ullrich für die nahtlose exzellente Betreuung von Beginn bis zum Ende der Arbeit. Sie stand allzeit mit hilfreichem fachlichem Rat und Unterstützungen bei der theoretischen und auch praktischen Durchführung zur Seite. Besonders danke ich ihr für die inspirierende Motivation, die nach jedem Treffen, auch nach langwieriger Laborarbeit, auf mich überging.

Professor Andreas Mackensen danke ich für die umfangreichen finanziellen Mittel, die bereitgestellt wurden, die sehr gute und professionelle Laborausstattung, Einrichtung und jegliche Unterstützung der Medizinischen Klinik V für Hämatologie und Internistische Onkologie, sowie für die vielen schönen und inspirierenden Augenblicke, die ich auf den Cellular-Therapy Kongressen sowie den Forschungsretreats und den Jahresfeiern hatte.

Alexandra Abendroth (MTA), Dr. Kathrin Meinhardt und Dr. Irena Kröger und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe gilt mein besonderer Dank für die stets freundliche Atmosphäre und die Unterstützung bei der manchmal zähen Durchführung der Methoden.

Ich danke weiterhin der Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg, für die Ermöglichung der Dissertation sowie die gute Ausstattung und die guten Bedingungen, die das Entstehen dieser Arbeit erlaubten. Besonders Uwe Appelt hat durch seine erfahrene Bedienung des MoFlo Sorter Geräts eine ausgezeichnete Zellreinheit ermöglicht.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Interdisziplinäre Zentrum für klinische Forschung (IZKF) sowie meinen Mentoren PD Dr. Udo Gaipl und Dr. Ulrike Schleicher für die Förderung meiner Arbeit. Durch dieses konnte ich mein Engagement im Labor wesentlich intensivieren und ich erhielt Einsichten über den Tellerrand hinweg in andere Disziplinen der Naturwissenschaften.

Abschließend danke ich meiner Frau Dr. Leonie Anna Bittrich für Rat und Tat sowie für Geduld, die Durchsicht und die Korrektur.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Max Bittrich
Geburtsdatum	11. April 1986
Geburtsort	Erfurt
Anschrift	Martin-Luther-Str. 5, 97072 Würzburg
Familienstand	Verheiratet
Ausbildung	
seit 2013	Assistenzarzt für Innere Medizin, Hämatologie und internistische Onkologie, Universitätsklinikum Würzburg
2012	Staatsexamen und Approbation
2006-2012	Studium der Humanmedizin, FAU Erlangen-Nürnberg
2005	Wehrdienst
2004	Abitur
1992-2004	Schulausbildung
Ausgewählte Präsentationen des wissenschaftlichen Projekts	
30.04.2009	NK Zell Retreat, Erlangen
13.11.2009	BMT Retreat 2009, Freiburg
03.03.2010	IZKF Jahrestreffen, Erlangen
15.07.2010	BMT Retreat 2010, Schwandorf
13.03.2015	OnkoRetreat 2015, Schwarzach
Stipendium	
Doktorandenstipendium „MD-Thesis scholarship“ Interdisziplinäres Zentrums für klinische Forschung (IZKF), Universitätsklinikum der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg	