

# **Charakterisierung von Tumor-induzierten Memory-like NK Zellen**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Lisa Schwab  
aus Miltenberg

Tübingen  
2019

Gedruckt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen.

Tag der mündlichen Qualifikation:

04.04.2019

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

PD Dr. Dr. Maya C. André

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>3</b>
<b>I. Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>7</b>
1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem .....	7
1.2 Natürliche Killerzellen.....	7
1.2.1 Funktionalität der NK Zellen .....	8
1.2.2 Oberflächenrezeptoren der NK Zellen .....	10
1.2.2.1 Inhibitorische Rezeptoren .....	11
1.2.2.2 Aktivierende Rezeptoren .....	11
1.2.3 Memory-like Funktion der NK Zellen .....	13
1.3 T Zellen .....	16
1.3.1 T Zellaktivierung.....	17
1.3.2 CD4 <sup>+</sup> T Zellen.....	17
1.3.3 CD8 <sup>+</sup> T Zellen.....	19
1.3.4 CD8 <sup>+</sup> Memory T Zellen.....	19
1.4 Interaktionen von NK und T Zellen.....	20
1.5 Akute kindliche Leukämien .....	23
1.6 Zielsetzung.....	24
<b>2 Material .....</b>	<b>25</b>
2.1 Geräte .....	25
2.2 Verbrauchsmaterialien .....	26
2.3 Software .....	26
2.4 Reagenzien .....	26
2.5 Medien und Puffer.....	27
2.6 Zelllinien/primäre Leukämien .....	27
2.7 Farbstoffe .....	28
2.8 Antikörper und Isotypen .....	28
2.9 Interleukine.....	30
2.10 Kits.....	31
<b>3 Methoden .....</b>	<b>32</b>
3.1 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs) .....	32
3.2 Zellzahlbestimmung .....	32
3.3 Einfrieren von Zellen .....	32
3.4 Auftauen von Zellen .....	33
3.5 Isolation primärer NK Zellen.....	33
3.6 Depletion von NK Zellen .....	33
3.7 Depletion von T Zellen .....	34
3.8 Generierung von Memory-like NK Zellen .....	34
3.9 Isolation von membranständigen Proteinen.....	36

3.10	Blockade von NKG2D auf NK Zellen .....	36
3.11	Transwell-Experimente .....	37
3.12	Cytokin-Messungen im Überstand .....	38
3.13	Live-Cell Imaging .....	39
3.14	Cytotoxizitätstest .....	39
3.15	Kokultur von NK Zellen und PBMCs.....	40
3.16	Proliferation .....	41
3.17	Durchflusszytometrische Färbungen .....	41
3.17.1	CFSE-Markierung .....	42
3.17.2	Oberflächenfärbungen mit Primärantikörpern .....	42
3.17.2.1	CD56 und CD3 Frequenz .....	42
3.17.2.2	CD4 und CD8 Frequenz .....	42
3.17.2.3	NKG2D Kontrollfärbung .....	43
3.17.2.4	CD19 Kontrollfärbung .....	43
3.17.2.5	Oberflächenfärbung von NK Zellen .....	43
3.17.2.6	Oberflächenfärbung von T Zellen .....	44
3.17.2.7	Oberflächencharakterisierung von Tumorzellen .....	44
3.17.3	Lebend-Tot Färbungen .....	45
3.17.3.1	Lebend-tot Färbung mit ARD-Pacific Blue.....	45
3.17.3.2	Lebend-tot Färbung mit ARD-Zombie Aqua .....	45
3.17.3.3	Lebend-tot Färbung mit ARD-AF350 .....	46
3.17.4	Färbung von regulatorischen T Zellen .....	46
3.18	Mykoplasmentest.....	47
3.19	Statistik .....	47
3.19.1	Spezifische Lyse .....	48
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>49</b>
4.1	<i>In vitro</i> Cytotoxizitätstests von TIML-NK Zellen .....	49
4.2	Apoptose-Induktion von TIML-NK Zellen .....	52
4.3	Charakterisierung der verwendeten Tumorzellen .....	54
4.4	Untersuchungen zum Zell-Kontakt bei der Konvertierung in TIML-NK Zellen 55	
4.5	Die Rolle der NKG2D/IL15 Achse bei der Konvertierung in TIML-NK Zellen 59	
4.6	Phänotypische Untersuchungen von TIML-NK Zellen .....	61
4.7	Proliferation von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T Zellen .....	62
4.8	Proliferation der CD4 <sup>+</sup> regulatorischen T Zellen.....	63
4.9	Proliferation der CD8 <sup>+</sup> T Zell-Subpopulationen .....	65
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
5.1	Tumorpriming führt zur Konvertierung in tumorspezifische TIML-NK Zellen	69
5.2	Die Konvertierung in TIML-NK Zellen ist Zell-Kontakt abhängig.....	73
5.3	Die NKG2D/IL15 Achse ist bei der Konvertierung nicht beteiligt .....	75
5.4	TIML-NK Zellen besitzen keinen distinkten Phänotyp.....	76
5.5	Immunregulatorische Funktionen von Memory-like NK Zellen.....	77
5.6	Fazit und Ausblick .....	80

<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>II.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>98</b>
<b>III.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>102</b>
<b>IV.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>103</b>
<b>V.</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>104</b>
<b>VI.</b>	<b>Beteiligung .....</b>	<b>104</b>
<b>VII.</b>	<b>Publikationen .....</b>	<b>105</b>
<b>VIII.</b>	<b>Danksagung .....</b>	<b>106</b>

## I. Zusammenfassung

Natürliche Killerzellen (NK Zellen) gehören zur angeborenen Immunabwehr und sind als wichtige Effektorlymphozyten an der Abwehr virusinfizierter und maligner Zellen beteiligt. Obwohl das immunologische Gedächtnis normalerweise durch Zelltypen des adaptiven Immunsystems vermittelt wird, konnten in den letzten Jahren auch Memory-Eigenschaften für NK Zellen beschrieben werden. In der Arbeitsgruppe André und in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein vorausgehender Kontakt mit bestrahlten Tumorzellen, ein sogenanntes Priming, zur Ausbildung Tumor-induzierter Memory-like (TIML) NK Zellen führt. Diese zeichnen sich durch eine gesteigerte Funktionalität verglichen mit unstimulierten NK Zellen aus. *In vitro* konnte belegt werden, dass diese TIML-NK Zellen tumorspezifisch sind, d.h. die erhöhte Funktionalität äußert sich nur gegen jene Tumorentität, welche auch im Primingprozess beteiligt war. Primingexperimenten mit Tumorfragmenten zeigten, dass ein direkter Kontakt zwischen Rezeptoren und Liganden der Tumor- und NK Zellen nötig ist. Neu exprimierte Rezeptoren auf der Oberfläche der Tumorzellen sowie sezernierte Cytokine führen nicht zu einer Konvertierung in TIML-NK Zellen. Diese Daten werden von Transwell-Experimenten, in welchen NK Zellen und Tumorzellen während des Primingprozesses keinen direkten Kontakt miteinander eingehen konnten, bestätigt. Durch weitere Primingversuche in Anwesenheit des blockierenden anti-NKG2D Antikörpers, wurde die Bedeutung der NKG2D/IL15 Achse für die Ausbildung von TIML-NK Zellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass die NKG2D/IL15 Achse keine Rolle bei der Konvertierung in Memory-like NK Zellen spielt.

Neben ihrer cytotoxischen Aktivität sind NK Zellen wichtige immunregulatorische Zellen. Sie verbinden unter anderem durch Sekretion von Cytokinen sowie Chemokinen die angeborene und adaptive Immunantwort. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde ein Kokulturmodell mit NK Zellen und PBMCs etabliert, um den Einfluss naiver und TIML-NK Zellen auf die T Zellantwort zu untersuchen. Diese Analysen könnten Aufschluss über eine mögliche schädliche *Graft versus Host Disease* (GvHD) oder verstärkte *Graft versus Leukämie* (GvL) Effekte durch T Zellen geben. Bestehende adoptive NK Zelltransferprotokolle könnten durch die Verwendung von TIML-NK Zellen und ihren adaptiven Eigenschaften somit verbessert werden, was einen weiteren Schritt in Richtung individualisierte Behandlungsstrategie für den Patienten bedeutet.

# 1 Einleitung

## 1.1 Angeborenes und adaptives Immunsystem

Immunologie ist die Lehre der körperlichen Abwehr von Krankheitserregern auf zellulärer und molekularer Ebene (Murphy *et al.*, 2012). Das Immunsystem basiert auf der Aktivität von Leukozyten, welche sich aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle entwickeln, der hämatopoetischen Stammzelle (*hematopoietic stem cell*, HSC), und teilen sich in die lymphatische und myeloide Zelllinie auf. Zur lymphatischen Zellreihe gehören beispielsweise natürliche Killerzellen (NK Zellen), sowie T und B Zellen, während zu der myeloiden Reihe unter anderem Monozyten und Makrophagen gezählt werden (Murphy *et al.*, 2012). Außerdem wird das Immunsystem des Menschen in die angeborene und adaptive Immunabwehr unterteilt. Die angeborene Immunabwehr ist durch die genetische Erbinformation festgelegt und kann Pathogene schnell bekämpfen. Die wichtigsten Zellen des angeborenen Immunsystems sind Phagozyten, dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) und NK Zellen. T und B Zellen repräsentieren das adaptive Immunsystem, welches sich im Laufe des Lebens weiterentwickelt und sich dadurch neuen oder veränderten Krankheitserregern anpassen und schlussendlich spezifisch reagieren kann (Chaplin, 2010; Murphy *et al.*, 2012).

## 1.2 Natürliche Killerzellen

1975 beschrieben unabhängig voneinander Herberman und Kiessling einen neuen Zelltyp, welcher in der Lage war allogene Tumorzellen ohne vorausgehende Stimulation zu lysieren (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975). Diese „natürliche Cytotoxizität“ wurde diesen Zellen zugeschrieben und der Begriff Natürliche Killerzellen (NK Zellen) eingeführt. In den letzten 40 Jahren wurde das Wissen über die Funktion und die Regulation der NK Zellen weiter vertieft (Caligiuri, 2008; Watzl, 2014).

NK Zellen sind relativ kurzlebige, jedoch äußerst wichtige Effektorlymphozyten und zählen zum angeborenen Immunsystem. Wie bereits einleitend erwähnt, entwickeln sie sich im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle und verteilen sich nach ihrer Entwicklung im gesamten lymphatischen und nicht-lymphatischen Gewebe wie Knochenmark, Lymphknoten, Milz, peripheres Blut, Lunge und Leber (Bodduluru *et al.*, 2015; Westermann *et al.*, 1992). Humane NK Zellen stellen etwa 10 - 15 % aller peripheren Lymphozyten dar und sind phänotypisch anhand ihrer CD56- und CD16-

Expression bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD3 klassifiziert (Bodduluru *et al.*, 2015; Cooper *et al.*, 2001). Anhand des Expressionslevels von CD56 können zwei große Subpopulationen unterschieden werden: CD56*dim* und CD56*bright*. Mit etwa 90 % exprimiert der Großteil der NK Zellen wenig CD56 (CD56*dim*) aber viel CD16. Im Gegensatz dazu exprimieren die restlichen 10 % viel CD56 (CD56*bright*) jedoch wenig bis kein CD16 auf der Oberfläche (Cooper *et al.*, 2001). Frühe funktionelle Studien von Lanier über die Subpopulationen ergaben, dass CD56*dim* Zellen eher Cytotoxizität vermitteln, während CD56*bright* Zellen verstärkt Cytokine produzieren (Cooper *et al.*, 2001; Lanier *et al.*, 1986).

Neben ihrer Fähigkeit, Tumorzellen spontan zu lysieren, spielen NK Zellen auch in der Virusabwehr eine bedeutende Rolle (Bodduluru *et al.*, 2015; Caligiuri, 2008; Campbell *et al.*, 2013). NK Zellen haben mehrere Möglichkeiten an einer Immunantwort teilzunehmen: durch die Vermittlung zellulärer Cytotoxizität, die Sekretion von Cytokinen und Chemokinen sowie die direkte zelluläre Interaktion mit anderen Immunzellen (Watzl, 2014).

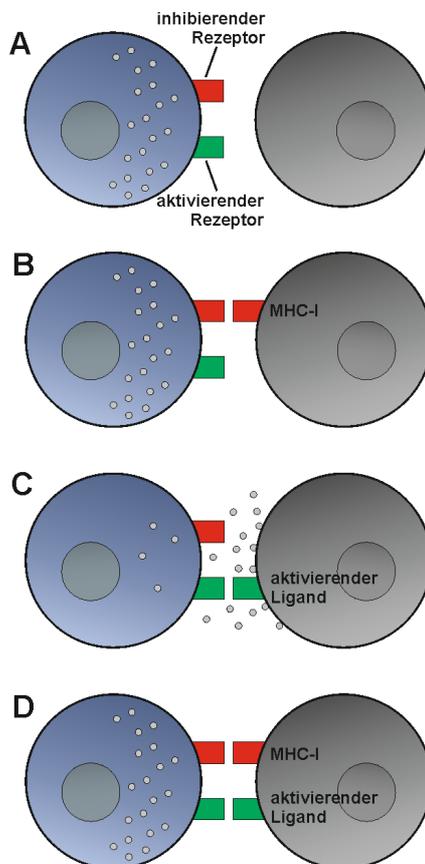
Die Cytotoxizität wird unter anderem durch Exozytose oder auch bestimmte Oberflächenrezeptoren vermittelt und wird im nachfolgenden Kapitel genauer betrachtet (Kapitel 1.2.1). NK Zellen sind des Weiteren wichtige Produzenten der Cytokine IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ), TNF (Tumor- nekrose Faktor), GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) sowie anderen Cytokinen und Chemokinen (Caligiuri, 2008). Aufgrund ihrer Produktion von IFN- $\gamma$  wurden die NK Zellen zunächst der ILC Gruppe 1 (*innate lymphoid cell group 1*) zugeordnet, mittlerweile jedoch werden sie aufgrund ihrer cytotoxischen Fähigkeit als eigenständige Gruppe betrachtet (Artis *et al.*, 2015; Spits *et al.*, 2016).

Durch die Produktion dieser Cytokine und durch direkten zellulären Kontakt spielen NK Zellen bei der Interaktion von Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) eine zentrale Rolle in der Immunregulation (Campbell *et al.*, 2013).

### **1.2.1 Funktionalität der NK Zellen**

Mitte der 70er Jahre wurde beschrieben, dass NK Zellen selektiv Zielzellen mit verminderter MHC-I (*major histocompatibility complex class I*) Expression lysieren („*missing self*“ Hypothese) (Herberman *et al.*, 1975; Karre, 1997; Kiessling *et al.*, 1975). Heute weiß man jedoch, dass ein Fehlen von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche nicht unbedingt zur NK Zell-vermittelten Lyse führt, sondern die cytotoxische Aktivität eine Folge aus verschiedenen aktivierenden und inhibierenden Signalen ist.

Wie in Abbildung 1 dargestellt, erkennen reife NK Zellen mit ihren inhibitorischen Rezeptoren MHC-I Moleküle, die auf allen körperekernhaltigen Zellen exprimiert werden.



**Abbildung 1 Schematische Darstellung der NK Zellerkennung und deren Folgen.** Übersicht möglicher Interaktionen zwischen NK Zellen mit ihren potentiellen Zielzellen sowie mögliche Folgen. **(A)** Exprimieren Zielzellen weder aktivierende (grün) noch inhibitorische (rot) Liganden, werden diese nicht lysiert. **(B)** Finden inhibitorische Rezeptoren passende Liganden auf der Zielzelle, z.B. MHC-I, wird die NK Zellantwort ebenfalls unterdrückt. **(C)** Fehlt die Interaktion zwischen inhibitorischen Rezeptoren und den MHC-I Molekülen und werden gleichzeitig Liganden für aktivierende Rezeptoren exprimiert, so werden die lytischen Proteine von der NK Zelle ausgeschüttet, was die Lyse der Zielzelle zur Folge hat. **(D)** Exprimiert die Zielzelle Liganden für die inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren, ist die lytische Aktivität der NK Zelle von der Signalstärke der einzelnen Interaktionen abhängig. Eigene Darstellung nach Lanier *et al.*, 2005.

Durch diese Interaktion wird ein inhibitorisches Signal an die NK Zellen gesendet und ihre Aktivierung unterdrückt, da die Zelle als körpereigen („self“) erkannt wird (Caligiuri, 2008; Campbell *et al.*, 2013). Durch maligne Transformation oder Virusinfektion können MHC-I Moleküle auf der Oberfläche dieser Zielzellen fehlen, was dazu führt, dass inhibitorische Rezeptoren auf NK Zellen nicht mit ihren Liganden interagieren können und somit auch kein supprimierendes Signal gesendet wird. Dies allein hat allerdings nicht die Lyse der Zielzelle zur Folge (Abbildung 1 A). Zusätzlich können Zielzellen nach zellulärem Stress Liganden für aktivierende Rezeptoren der NK Zellen exprimieren (Biassoni *et al.*, 2000; Caligiuri, 2008; Lanier, 2005; Vivier *et al.*, 2008). Durch Bindung eines aktivierenden

Rezeptors der NK Zelle wird ein aktivierendes Signal an die NK Zelle geschickt. Die fehlende inhibitorische bei gleichzeitig aktivierender Interaktion hat dann die Lyse der Zielzelle zur Folge (Abbildung 1 C). Exprimiert eine Zielzelle sowohl aktivierende als auch inhibitorische Liganden auf ihrer Oberfläche, hängt es vom Expressionsniveau der jeweiligen Rezeptoren und der daraus resultierende Signalstärke ab (Abbildung 1 D) (Lanier, 2005).

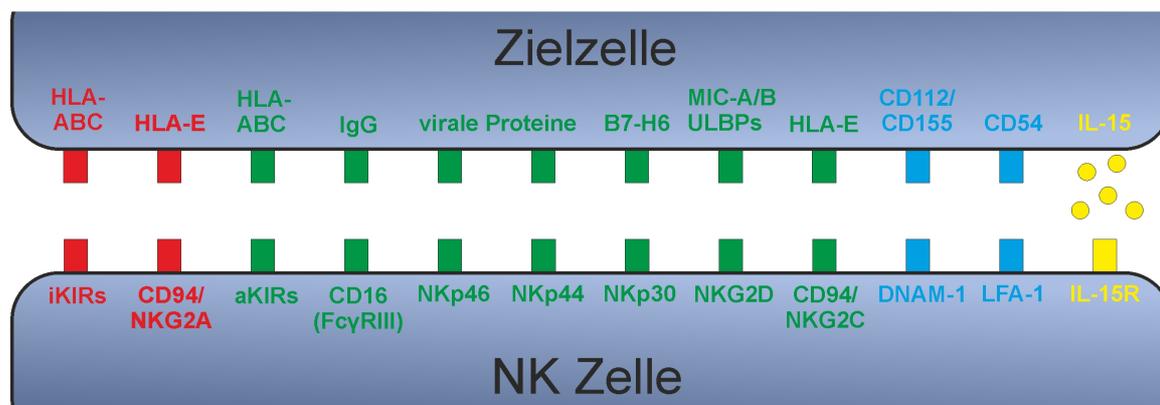
Der CD16 Rezeptor wurde als erster Aktivierungsrezeptor auf NK Zellen beschrieben und ist auch am besten charakterisiert. Er bindet den konstanten Teil (Fc-Teil) der IgG-Antikörper und ist so verantwortlich für die Antikörper-vermittelte zelluläre Cytotoxizität (ADCC; *antibody-dependent cellular cytotoxicity*) (Colucci *et al.*, 2003; Lanier, 2005). Alle aktivierenden Signale haben zur Folge, dass die cytoplasmatischen Granula der NK Zellen freigesetzt werden, welche cytotoxische Proteine wie Perforin und Granzyme enthalten. Durch das porenbildende Protein Perforin durchdringt Granzym die Zellmembran der Zielzelle, um dort den programmierten Zelltod auszulösen (Murphy *et al.*, 2012).

Neben dem intrinsischen Signalweg ist auch der extrinsische Apoptoseweg als Möglichkeit zum Abtöten von Zielzellen beschrieben und bei NK Zellen unter anderem über das TRAIL-Protein (*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) vermittelt. NK Zellen exprimieren TRAIL auf ihrer Oberfläche, welcher mit den beiden „Todesrezeptoren“ TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) interagiert. Wenn NK Zellen auf diese Weise Zielzellen erkennen, wird intrazellulär durch den DISC (*death-inducing signalling complex*) das Proenzym Caspase 8 in der Zielzelle aktiviert, was schließlich zur Apoptose führt (Falschlehner *et al.*, 2007; Johnstone *et al.*, 2008). Auf ähnliche Weise agiert der Transmembran-Rezeptor Fas-Ligand (FasL) auf der Oberfläche der NK Zellen. Nach Interaktion mit dem Oberflächenprotein Fas auf Zielzellen wird dessen intrazelluläre Domäne aktiv, löst eine enzymatische Kaskade der Caspasen aus, was schließlich zur Apoptose in der Zielzelle führt (Nagata *et al.*, 1995; Zamai *et al.*, 1998).

### **1.2.2 Oberflächenrezeptoren der NK Zellen**

Obwohl NK Zellen zur Lymphozytenreihe gehören, unterscheiden sie sich stark von T und B Lymphozyten, da NK Zellen keine Antigen-spezifischen, sondern keimbahnkodierte Rezeptoren exprimieren (Watzl *et al.*, 2014). Diese Rezeptoren beinhalten auch solche, die mit löslichen Liganden wie Cytokinen oder Antigenen auf der Oberfläche interagieren. Cytokin-Rezeptoren, wie IL15R, IL2R und IL21R sind an die *common-gamma chain* ( $\gamma_c$ ) gebunden und in die NK Zellentwicklung und -funktion involviert. An den IL15R bindet das Cytokin IL15, welches speziell für die Reifung und das Überleben von NK Zellen benötigt

wird (Vivier *et al.*, 2011). In Abbildung 2 sind die wichtigsten NK Zellrezeptoren schematisch dargestellt.



**Abbildung 2 Schematische Übersicht der wichtigsten NK Zellrezeptoren sowie deren Liganden.** Dargestellt sind die wichtigsten inhibitorischen (rot), aktivierenden (grün), kostimulatorischen (blau) und Cytokin-Rezeptoren (gelb) der NK Zelle sowie deren entsprechenden zellulären bzw. löslichen Liganden. Aktivierende KIRs (aKIRs); Inhibitorische KIRs (iKIRs); Eigene Darstellung nach Vivier *et al.*, 2011 und Watzl *et al.*, 2014.

### 1.2.2.1 Inhibitorische Rezeptoren

Humane NK Zellen erkennen MHC-I Moleküle mit ihren inhibitorischen Rezeptoren, wobei KIRs (*killer cell immunoglobulin-like receptors*) klassische MHC-I Moleküle (HLA-A,B,C) binden (Caligiuri, 2008; Long *et al.*, 2001). 15 Gene und 2 Pseudogene kodieren für die KIRs im Menschen, wobei die Gene innerhalb des Genoms der Bevölkerung variieren. Ein weiterer inhibitorischer Rezeptor stellt NKG2A dar, der zusammen mit CD94 ein Heterodimer bildet und nicht-klassische MHC-I Moleküle (HLA-E) bindet. Alle inhibitorischen Rezeptoren tragen ein ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif*) in ihrer cytoplasmatischen Domäne (Bianconi *et al.*, 2001; Lanier, 2005). Eine Bindung dieser Rezeptoren durch MHC-I induziert dann die Phosphorylierung der ITIMs, was zur Rekrutierung von Phosphatasen und schließlich zur Unterdrückung zellulärer Aktivität führt (Lanier, 2005; Raulet *et al.*, 2001). Auf diese Weise können gesunde körpereigene Zellen von virusinfizierten oder Krebszellen unterschieden werden.

### 1.2.2.2 Aktivierende Rezeptoren

Neben den inhibitorischen Rezeptoren spielen auch die aktivierenden eine wichtige Rolle bei der Regulation von NK Zellen. Die Signalwege der aktivierenden Rezeptoren zeigen viele Gemeinsamkeiten mit den inhibitorischen Rezeptoren: aktivierende Signale werden durch Transmembran-Adapterproteine auch hier über aktivierende Motive, sogenannte ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), in der cytoplasmatischen

Domäne weitergeleitet. Zu den Adapterproteinen der NK Zellen zählen CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  und DAP12. Die Assoziation dieser ITAM Adapterproteine und ihren Rezeptoren ist meist durch die Interaktion in der Transmembranregion vermittelt (Lanier, 2003). Zu diesen Rezeptoren gehören die natürlichen Cytotoxizitätsrezeptoren (NCRs) NKp46, NKp30, NKp44 sowie CD16 und die aktivierende Variante der KIRs (Watzl, 2014). Der Rezeptor CD16, oder auch Fc $\gamma$ RIIIA, ist mit CD3 $\zeta$  und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  assoziiert und bindet den Fc-Teil von IgG, wodurch ADCC vermittelt wird (Kapitel 1.2.1). NKp46 wurde als erster der NCRs beschrieben und wird fast ausschließlich von humanen und murinen NK Zellen exprimiert (Kruse *et al.*, 2014; Walzer *et al.*, 2007). Bis heute ist für diesen aktivierenden Rezeptor noch kein zellulärer Ligand bekannt, wobei einige virale Antigene NKp46 aktivieren können (Kruse *et al.*, 2014). Ein weiterer Rezeptor aus der Gruppe der NCRs stellt NKp30 dar, der einige Eigenschaften mit NKp46 teilt. Er wird ebenfalls von allen reifen NK Zellen exprimiert und bindet neben einigen viralen Proteinen zelluläre Liganden wie BAT2 und B7-H6. B7-H6 kommt nicht auf gesundem Gewebe vor, sondern wird von humanen Tumorzellen und proinflammatorischen Monozyten oder Neutrophilen bei Entzündungsreaktionen exprimiert (Brandt *et al.*, 2009; Pogge von Strandmann *et al.*, 2007). NKp44 dagegen ist nicht wie NKp46 und NKp30 mit den Adapterproteinen CD3 $\zeta$  und Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  assoziiert, sondern mit DAP12. Außerdem wird der Rezeptor nur von IL2 aktivierten NK Zellen exprimiert und stellte somit den ersten Marker zur Identifizierung aktivierter NK Zellen dar (Biassoni *et al.*, 2000; Vitale *et al.*, 1998). NKp44 erkennt PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und NKp44L, welche beide von Tumorzellen exprimiert werden (Baychelier *et al.*, 2013; Rosental *et al.*, 2011). Ein weiterer wichtiger aktivierender Rezeptor auf NK Zellen ist NKG2D, welcher auch CD314 genannt wird. Dieser wird von cytolytischen Zellen des Immunsystems exprimiert und deshalb sowohl auf NK Zellen als auch auf CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T Zellen gefunden (Chan *et al.*, 2014; Raulet, 2003). Er gehört in die gleiche Rezeptorfamilie wie NKG2A, NKG2C und NKG2E, sollte aber dennoch getrennt betrachtet werden, da er nicht als Heterodimer mit CD94, sondern als Homodimer exprimiert wird. Im Menschen ist NKG2D ausschließlich mit dem Adapterprotein DAP10 assoziiert, welches intrazellulär ein Signalmotiv trägt und so die Signalweiterleitung sicherstellt. NKG2D bindet MHC-I verwandte Moleküle MIC-A und MIC-B sowie Cytomegalievirus UL16 Bindeproteine (ULBPs), welche nicht auf gesunden Zellen zu finden sind, jedoch von infizierten, transformierten und/oder gestressten Zellen exprimiert werden (Raulet, 2003). Beispielsweise zeigen 55 % der akuten myeloischen Leukämien eine Expression der NKG2D-Liganden (Sanchez-Correa *et al.*, 2011). Das Heterodimer CD94/NKG2C agiert als aktivierender Rezeptor und benötigt für eine stabile Expression an der Zelloberfläche und zur Signalweiterleitung das Adapterprotein DAP12 (Lanier *et al.*, 1998). Er bindet ebenfalls wie CD94/NKG2A an HLA-E, wenn auch mit niedrigerer

Affinität. Auch scheint das gebundene Peptid auf HLA-E eine große Rolle bei der Bindung von CD94/NKG2A bzw. CD94/NKG2C zu spielen (Lanier, 2005; Michaelsson *et al.*, 2002). Obwohl die extrazelluläre Domäne von NKG2E der von NKG2C sehr ähnlich ist, konnte bisher keine Assoziation mit DAP12 nachgewiesen werden (Lanier, 2005).

Außerdem exprimieren NK Zellen noch weitere Rezeptoren mit verschiedenen Tyrosin-basierten Signalmotiven in ihrer cytoplasmatischen Domäne, wie z.B. den aktivierenden Oberflächenrezeptor DNAM-1 oder auch CD226 genannt. CD112, auch als PVR (*polio virus receptor*) bekannt, und CD155 bzw. Nectin-2 konnten als Liganden von DNAM-1 identifiziert werden (Bottino *et al.*, 2003; Lanier, 2005). Die Bindung von DNAM-1 auf NK Zellen mit CD112 und CD155, welche auf humanen Tumorzellen überexprimiert werden, steigert die NK Zell-vermittelte Cytotoxizität und Cytokinproduktion (Lanier, 2005).

### 1.2.3 Memory-like Funktion der NK Zellen

Das immunologische Gedächtnis ist klassischerweise so definiert, dass sich eine Zelle des Immunsystems nach Erstkontakt mit einem Pathogen dieses merken kann, um dann bei einem Zweitkontakt schneller und spezifischer zu reagieren.

Dieses Phänomen ist Eigenschaft der B und T Zellen des adaptiven Immunsystems, da diese mit ihren rekombinanten Rezeptoren in der Lage sind, eine Vielzahl an Zellen mit unterschiedlichen Spezifitäten zu generieren. Grundlage hiervon sind die variablen Regionen des Antigenrezeptors, welche in Gruppen von Gensegmenten vererbt werden. Durch DNA-Rekombination während der Entwicklung von B und T Zellen werden diese verschiedenen Gensegmente miteinander verknüpft, wodurch sich viele verschiedene Möglichkeiten an Rezeptorketten ergeben (Murphy *et al.*, 2012).

Gedächtnis-Zellen sind langlebig und präsentieren nach Kontraktion proliferierende, Antigen-spezifische Zellen, welche sich phänotypisch und epigenetisch von ihren naiven Zellen unterscheiden (Min-Oo *et al.*, 2013; Watzl, 2014; Zediak *et al.*, 2011). Nach Erstkontakt mit einem Antigen werden naive T Zellen aktiviert und expandieren sehr stark, um Effektorfunktionen auszuüben. Danach werden 90 - 95 % der aktivierten Zellen apoptotisch, wobei einige Zellen als langlebige Gedächtniszellen erhalten bleiben, um bei einer zweiten Immunantwort, der sogenannten *recall response*, das Antigen erneut zu erkennen und schneller reagieren zu können (Sprent *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2007).

Obwohl NK Zellen mit ihren keimbahnkodierten Rezeptoren der angeborenen Immunabwehr angehören, konnte in jüngsten Studien gezeigt werden, dass die

Gedächtniseigenschaft nicht nur eine Fähigkeit der adaptiven Immunantwort ist, sondern auch bei NK Zellen ausgebildet werden kann. Bis heute konnten verschiedene Gedächtniseigenschaften für NK Zellen beschrieben werden, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind (Cooper *et al.*, 2009; O'Leary *et al.*, 2006; Paust *et al.*, 2010; Romee *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2009).

**Tabelle 1 Übersicht adaptiver Immuneigenschaften von NK Zellen.** Cytomegalievirus (CMV); murines Cytomegalievirus (MCMV); humanes Cytomegalievirus (HCMV); Interleukin (IL); Interferon (IFN); Natürliche Killerzellgruppe 2 (NKG2); Chemokin CXC Rezeptor (CXCR); Eigene Darstellung nach Rölle *et al.*, 2013; Min-Oo *et al.*, 2013.

Memory-Typ	Spezies	Generierung	Verantwortlicher Rezeptor	↑ IFN- $\gamma$ Synthese
<b>Leber-ständige Memory NK Zellen</b>	murin	Hapten	CXCR6	-
<b>CMV-spezifische NK Zellen</b>	murin	MCMV-Infektion	Ly49H	Ja
	human	HCMV-Infektion	NKG2C	Ja
<b>Cytokin-induzierte Memory-like NK Zellen</b>	murin	IL12, IL15, IL18	?	Ja
	human	IL12, IL15, IL18	?	Ja

Bereits 2006 konnten von Adrian und Kollegen in *Rag2*-defizienten Mäusen, denen B und T Zellen fehlen, nach vorausgehendem Kontakt mit chemischen Hapten, wie Oxazolone und 2,4-Dinitrofluorbenzol, eine gesteigerte NK Zellantwort zeigen (O'Leary *et al.*, 2006). Bisher konnte eine Hapten-induzierte Kontakt-Hypersensibilität (*contact hypersensitivity*, CHS) nur für das adaptive Immunsystem belegt werden, wobei diese chemischen Moleküle als fremd erkannt und Hapten-spezifische, langlebige Gedächtniszellen ausgebildet werden. Die Immunantwort der NK Zellen war ebenfalls spezifisch für die verwendete Chemikalie und konnte mindestens vier Monate nach dem ersten chemischen *Priming* nachgewiesen werden. In weiteren Mausexperimenten mit zusätzlichem *IL2R $\gamma$ -Knockout*, also zusätzlich fehlenden reifen NK Zellen, oder auch einer NK Zell-Depletion, konnte keine CHS mehr nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Bedeutung der NK Zellen in diesem Zusammenhang. Interessanterweise war die Zellantwort auch noch nach adoptivem Transfer auf naive Mäuse nachweisbar (O'Leary *et al.*, 2006). Eine weitere Studie derselben Arbeitsgruppe weitete das bisher beschriebene Memory-Modell auch auf Virusinfektionen aus: Mäuse, welchen infektiöse VLPs (*virus-like particles*) mit Proteinen von *Influenza* oder HI-Viren *subcutan* gespritzt wurde, überlebten eine weitere Infektion mit diesen Viren drei Monate später besser, verglichen mit naiven Mäusen. Des Weiteren

konnten NK Zellen aus Mäusen, welche zuvor mit VLPs geimpft wurden, den Schutz gegenüber einer Infektion mit diesem Virus auch auf naive Mäuse übertragen (Paust *et al.*, 2010). In beiden Studien konnten CXCR6<sup>+</sup> Leber-ständige NK Zellen nicht zur Antigenerkennung, aber zum Überleben dieser Memory-NK Zellen und für Effektor-Funktionen als notwendig erachtet werden (O'Leary *et al.*, 2006; Paust *et al.*, 2010).

Nach dieser ersten Erkenntnis über Leber-ständige Memory NK Zellen, wurden Untersuchungen zu Gedächtnis NK Zellen auch auf andere Organe und Krankheiten ausgeweitet. Etwa 50 % der NK Zellen aus C57BL/6 Mäusen exprimieren den aktivierenden Rezeptor Ly49H, welcher spezifisch das MCMV (murines Cytomegalievirus) Protein m157 auf infizierten Zellen erkennt (Arase *et al.*, 2002; Dokun *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2002). In der Studie von Sun *et al.* konnte in diesem Zusammenhang die Ausbildung von Ly49H<sup>+</sup> Memory NK Zellen gezeigt werden (Sun *et al.*, 2009). Ly49H<sup>+</sup> NK Zellen proliferieren nach MCMV-Infektion, gehen daraufhin in eine Kontraktionsphase über und bilden schließlich langlebige Memory NK Zellen, welche bis zu 70 Tage nach Infektion nachgewiesen werden können. Dieser Memory Typ wird bei Restimulation mit einer erhöhten IFN- $\gamma$  Synthese, Degranulation und einem veränderten Phänotypen in Verbindung gebracht. Auch diese Zellen vermitteln Schutz gegenüber einer MCMV-Infektion nach adoptivem Transfer auf naive Mäuse, welche NK Zellen ohne Ly49H-Rezeptor besitzen. Außerdem ist für die Generierung dieser Memory-NK Zellen das Cytokin IL12 notwendig (Sun *et al.*, 2012).

Auch im Menschen konnte 2004 bereits gezeigt werden, dass nach einer HCMV (humanes Cytomegalievirus) Infektion CD94/NKG2C<sup>+</sup> NK Zellen häufiger vorkommen als bei HCMV<sup>-</sup> Individuen (Guma *et al.*, 2004). Dies legte die Vermutung nahe, dass analog zum MCMV-Modell mit dem Rezeptor Ly49H, ebenfalls Memory-NK Zellen durch HCMV im Zusammenhang mit NKG2C generiert werden können. Spätere Studien belegten die Expansion von NKG2C<sup>+</sup> NK Zellen bei erneuter oder Erst-Infektion mit HCMV in Patienten nach Transplantation (Della Chiesa *et al.*, 2012; Foley *et al.*, 2012; Lopez-Verges *et al.*, 2011). Diese NKG2C<sup>+</sup> NK Zellen produzieren mehr IFN- $\gamma$  und exprimieren den Rezeptor CD57, welcher ein Marker für terminale Differenzierung darstellt (Lopez-Verges *et al.*, 2011). Neben der phänotypischen Veränderung dieser adaptiven NK Zellen konnte auch ein Fehlen von verschiedenen Signalproteinen (Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ , SYK und EAT-2) sowie vom Transkriptionsfaktor PLZF beobachtet werden (Schlums *et al.*, 2015). Auch andere virale Infektionen, wie das Hantavirus, HIV oder Hepatitis B Virus, haben einen Einfluss auf die NKG2C<sup>+</sup> Subpopulation, jedoch lediglich bei HCMV<sup>+</sup> Individuen (Beziat *et al.*, 2012; Bjorkstrom *et al.*, 2011; Brunetta *et al.*, 2010). Hier ist eine Expansion ebenfalls auf NKG2C<sup>+</sup> NK Zellen beschränkt.

Des Weiteren konnte zuerst in Mäusen 2009 die Generierung von Memory-like NK Zellen durch kurze *in vitro* Stimulation von IL12, IL15 und IL18 in Abwesenheit eines Antigens gezeigt werden (Cooper *et al.*, 2009). Diese waren in der Lage bis zu vier Monate nach adoptivem Transfer in *Rag1*-defiziente Mäuse eine höhere Menge an IFN- $\gamma$  nach Restimulation zu sekretieren, verglichen mit NK Zellen, welche vor dem adoptiven Transfer nur mit IL15 behandelt wurden. Eine erhöhte Granzym B Expression sowie Effektorfunktion konnte für diesen Zelltyp bislang nicht belegt werden (Cooper *et al.*, 2009; Keppel *et al.*, 2013).

Ebenfalls sekretierten humane NK Zellen, welche für 16 h mit IL12, IL15 und IL18 versetzt wurden und nach Waschschritten nur in IL2 und IL15 kultiviert wurden, eine erhöhte IFN- $\gamma$  Menge nach Restimulation (Ni *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2012). Diese Eigenschaften der sogenannten Cytokin-induzierten Memory-like (CIML-) NK Zellen sowie eine Langlebigkeit *in vivo* und *in vitro*, konnte auch auf Tochterzellen übertragen werden. Des Weiteren konnte eine Hochregulation des IL2R $\alpha$  (CD25) nach IL12, IL15 und IL18 Behandlung beobachtet werden (Ni *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2012).

### 1.3 T Zellen

T-Lymphozyten, die im Thymus gebildet werden, wurden in den 1960er Jahren entdeckt und gehören der adaptiven Immunität an (Murphy *et al.*, 2012). Das Kennzeichen einer T Zelle ist die Expression des Antigen-erkennenden T Zell-Rezeptors (TCR) (Chien *et al.*, 1984). Es gibt zwei Formen des TCRs:  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten TCR, welcher von 95 % der peripheren T Zellen exprimiert wird, sowie ein  $\gamma$ - und  $\delta$ -Ketten TCR, der sich auf den restlichen T Zellen befindet (Davis *et al.*, 1988; Loh *et al.*, 1987). Jeder T Lymphozyt besitzt einen TCR, der zusammen mit CD3 T Zellrezeptorkomplexe ausbilden und so Signale intrazellulär weiterleiten kann (Hall, 2015; Smith *et al.*, 1989). Liganden des TCRs sind MHC-Moleküle mit ihrem gebundenen Peptid auf APCs, wie zum Beispiel DCs (Murphy *et al.*, 2012).

Die meisten TCR- $\alpha\beta^+$  T Zellen exprimieren des Weiteren einen von zwei Korezeptoren, CD4 oder CD8. Diese Proteine binden auch MHC-I und MHC-II und tragen zur TCR-Signalweiterleitung durch diese Interaktionen bei (Bosselut *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1989; Veillette *et al.*, 1989). CD4 bzw. CD8 definiert zwei unterscheidbare T Zelllinien, die sich sowohl in ihrer MHC-Spezifität und Funktionalität abgrenzen. Die überwiegende Zahl an CD4<sup>+</sup> T Zellen sind MHC II beschränkt und fungieren als T Helferzellen, welche die Zellen des Immunsystems durch Cytokinproduktion unterstützen. Im Gegensatz hierzu erkennen

CD8<sup>+</sup> T Zellen MHC-I und zeigen nach Aktivierung cytotoxische Eigenschaften (Bosselut *et al.*, 1999).

### 1.3.1 T Zellaktivierung

Für eine klonale Expansion und Differenzierung naiver T Zellen werden drei Signale benötigt: am wichtigsten ist hier das Antigen-spezifische Signal durch Interaktion des TCRs mit dem MHC-Peptid-Komplex. Das zweite Signal oder auch „kostimulatorische Signal“ ist nicht antigen-spezifisch und stellt die Expansion und das Überleben der naiven T Zelle sicher. Das dritte Signal wird durch sekretierte Cytokine vermittelt, welche die Differenzierung in T Zellsubpopulationen einleiten (Bromley *et al.*, 2001; Halloran, 2004; Murphy *et al.*, 2012).

Das kostimulatorische Signal kann durch eine Reihe von Rezeptorpaaren auf der Oberfläche von T Lymphozyten und APCs erfolgen, wobei B7/CD28 sowie CD40/CD40L die klassischen kostimulatorischen Interaktionen darstellen (Snanoudj *et al.*, 2007). Wenn B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86) auf der Oberfläche von DCs an CD28 auf T Zellen binden, wird in beiden Fällen die Produktion von verschiedenen Faktoren wie IL2, IL2R $\alpha$  (CD25) und CD40 Ligand induziert. Die Bindung von CD40 liefert wichtige Signale für die Antikörper-Produktion der B Zellen sowie die Hochregulation von B7 und MHC-Molekülen auf APCs, was schlussendlich zu einer Verstärkung des Antigen-spezifischen Signals 1 führt. Durch die Bindung von IL2 an seinen Rezeptor und die Aktivierung des Signalwegs mTOR, wird die Generierung von Effektor T Zellen sowie die klonale Expansion ausgelöst (Snanoudj *et al.*, 2007; van Kooten *et al.*, 1997). IL2 wird von der aktivierten T Zelle selbst produziert, wobei ohne IL2 kein Überleben der T Zelle möglich ist.

Das dritte Signal wird durch sekretierte Cytokine bereitgestellt und bestimmt die Differenzierung in die verschiedenen T Zellsubtypen (Kapitel 1.3.2 und 1.3.3) (Hirahara *et al.*, 2016).

### 1.3.2 CD4<sup>+</sup> T Zellen

T Zellen können durch ihre Korezeptoren noch weiter in CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T Zellen unterschieden werden. CD4<sup>+</sup> T Zellen sind T Helferzellen, welche durch die Produktion von spezifischen Cytokinen in der Immunabwehr eine zentrale Rolle spielen. Wie schon zuvor beschrieben, benötigen T Zellen drei Signale, wobei die sekretierten Cytokine die Differenzierung des T Zellsubtyps bestimmen (Hirahara *et al.*, 2016). Bereits 1986 konnten Mosmann und Coffman zeigen, dass sich die CD4 T Zelllinie in zwei Untergruppen anhand ihrer IFN- $\gamma$  bzw. IL-4 Sekretion einteilen lässt, sogenannte Th1 und

Th2 Zellen (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann *et al.*, 1989). Heute sind neben diesen beiden noch die Th9, Th17, Th22, regulatorischen (Tregs) und folliculären (Tfh) T Zellsubpopulationen bekannt (Ivanova *et al.*, 2015).

IL12 und IFN- $\gamma$  sind die Cytokine, welche eine Differenzierung naiver T Zellen in Th1 Zellen auslösen (Trinchieri *et al.*, 2003). IL12 wird in großen Mengen von APCs produziert und induziert außerdem NK Zellen, IFN- $\gamma$  zu sekretieren (Luckheeram *et al.*, 2012). Der IL12-Rezeptor wird bereits auf naiven CD4 T Zellen exprimiert und auf Th1 Zellen hochreguliert. IL12 und IFN- $\gamma$  aktivieren außerdem STAT4 (*signal transducer and activator of transcription*) und STAT1, die wiederum den Haupttranskriptionsfaktor T-bet (*T-box expressed in T cells*) induzieren und auf diese Weise die Differenzierung in die Subpopulation Th1 koordinieren (Afkarian *et al.*, 2002; Luckheeram *et al.*, 2012). Th1 Zellen sind bei der Beseitigung von intrazellulären Pathogenen beteiligt und sekretieren vor allem IFN- $\gamma$  und IL2 (Romagnani, 1999; Zhu *et al.*, 2008).

Die Differenzierung in Th2 Zellen wird durch IL4 und IL2 induziert. IL4 aktiviert hier STAT6, was nachfolgend die Expression des Haupttranskriptionsfaktor GATA3 (*GATA-binding protein*) hochreguliert. GATA3 ist verantwortlich für die Cytokinproduktion, Proliferation und verhindert die Differenzierung in Th1 Zellen (Kaplan *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 2006). Th2 Zellen produzieren die Effektor-Cytokine IL4, IL5, IL9, IL13, IL10 und IL25, welche wichtig für die humorale Immunantwort gegen Parasiten und allergische Reaktionen sind (Pearce *et al.*, 1991; Robinson *et al.*, 1992; Shimoda *et al.*, 1996).

Th17 Zellen sind bei den Immunreaktionen gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze im Darmtrakt wichtig. Außerdem sind sie bei der Entstehung von Autoimmunreaktionen beteiligt (Annunziato *et al.*, 2007; Weaver *et al.*, 2006). Sie werden als unabhängige T Zelllinie neben Th1 und Th2 Zellen betrachtet und ihre Differenzierung ist abhängig von IL6, IL21 und TGF- $\beta$  (Harrington *et al.*, 2006; Luckheeram *et al.*, 2012; Weaver *et al.*, 2006). Die Differenzierung ist unabhängig von T-bet und GATA-3, sondern von dem Transkriptionsfaktor *retinoic acid receptor-related orphan receptors* (ROR $\gamma$ t) reguliert (Hirahara *et al.*, 2010; Ivanov *et al.*, 2006). Diese Zellen produzieren IL17A und das verwandte IL17F, sowie IL21, IL22 und GM-CSF (Ivanova *et al.*, 2015; Korn *et al.*, 2009).

Regulatorische T Zellen bzw. Tregs sind in der Lage, Immunantworten von Effektor T Zellen zu supprimieren und Autoimmunerkrankungen sowie übermäßige Entzündungsreaktionen zu vermeiden (Murphy *et al.*, 2012; Sakaguchi, 2005). Hauptsächlich werden TGF- $\beta$ , IL35 und IL10 produziert, wobei IL10 ein starkes inhibitorisches Cytokin darstellt (Asseman *et al.*, 1999; Couper *et al.*, 2008). Der

Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead transcription factor*) wird speziell von dieser Zelllinie exprimiert und kann zusammen mit den Oberflächenmolekülen CD4 und CD25 genutzt werden, um Tregs phänotypisch zu identifizieren (Luckheeram *et al.*, 2012).

### 1.3.3 CD8<sup>+</sup> T Zellen

Neben CD4<sup>+</sup> T Zellen gibt es auch noch T Zellen, die einen CD8 Korezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Wie CD4<sup>+</sup> T Zellen benötigen auch diese CD8<sup>+</sup> T Zellen 3 Signale, um aktiviert zu werden. Das dritte, Cytokin-vermittelte Signal wird hier von IL12 oder IFN- $\alpha$  bzw. IFN- $\beta$  geliefert und induziert die Entwicklung der cytolytischen Aktivität (Curtsinger *et al.*, 2005; Gately *et al.*, 1992; Mescher *et al.*, 2006). Die Lyse der Zielzellen kann von den CD8<sup>+</sup> T Zellen oder auch CTLs (*cytotoxic T lymphocytes*) auf mindestens drei unterschiedlichen Wegen realisiert werden. Der erste ist Cytokin-vermittelt, d.h. CD8<sup>+</sup> T Zellen produzieren IFN- $\gamma$  und TNF, was schließlich eine Kaskade der Caspasen in der Zielzelle auslöst und Apoptose induziert. Der zweite Weg wird über die Freisetzung lytischer Granula mit Perforin und Granzym B, ähnlich zu NK Zellen, realisiert. Der dritte Signalweg ist über die Interaktion des Todesrezeptors Fas/FasL reguliert (Andersen *et al.*, 2006; Kagi *et al.*, 1996; Murphy *et al.*, 2012). Dadurch sind CTLs für die Abwehr und Kontrolle von bakteriellen und viralen Infektionen sowie Tumorzellen wichtig (Williams *et al.*, 2007).

### 1.3.4 CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen

Wie bereits einleitend erwähnt, ist die Fähigkeit nach einer akuten Infektion ein immunologisches Gedächtnis auszubilden das Kennzeichen der adaptiven Immunität. Hierbei „erinnern“ sich die Zellen an das ursprüngliche Pathogen und können bei Re-Infektion schneller und besser reagieren (Cui *et al.*, 2010; Murphy *et al.*, 2012).

Für die Ausbildung von langlebigen Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen ist eine komplexe Abfolge an Ereignissen nötig: nach Antigen-Erkennung und Aktivierung naiver T Zellen, differenzieren diese in Effektor T Zellen und proliferieren stark (Expansion). Nach erfolgreicher Infektionsabwehr gehen etwa 95 % der Effektor T Zellen in Apoptose über, während sich der kleinere Teil zu langlebigen Gedächtnis T Zellen entwickelt (Cui *et al.*, 2010; Hammarlund *et al.*, 2003; Lauvau *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2007). Die Zahl der Memory CD8<sup>+</sup> T Zellen ist über die Zeit relativ stabil, was durch die Interaktion mit IL7 und IL15 sichergestellt wird (Klonowski *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2006; Surh *et al.*, 2005).

Außerdem kann die Population der CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen noch in weitere Subpopulationen eingeteilt werden (Mahnke *et al.*, 2013). Zuerst konnten diese

Gedächtniszellen in sogenannte *central memory T cells* (TCM) und *effector memory T cells* (TEM) anhand ihres Phänotyps und ihrer Funktion eingeteilt werden (Sallusto *et al.*, 2004). Der Schutz durch Gedächtniszellen wird vor allem durch TEM gewährleistet, die in entzündetes peripheres Gewebe einwandern und dort Effektorfunktionen vermitteln. Im Gegensatz hierzu sind TCM in sekundären lymphatischen Organen lokalisiert und zeigen nahezu keine Effektorfunktionen. Nach Antigen-Kontakt proliferieren und differenzieren sie jedoch schnell in Effektor T Zellen. Aufgrund dessen ist nahe liegend, dass sich TEM und TCM in der Expression des Chemokin-Rezeptors CCR phänotypisch unterscheiden, der die Lokalisation in sekundären lymphatischen Organen kontrolliert. Während TCM CCR7<sup>+</sup> sind, haben TEM die Expression von CCR7 verloren (Sallusto *et al.*, 1999). Eine zusätzliche Beurteilung der Expression des CD45RA und CD45RO Rezeptors erlaubt dadurch die Unterscheidung zwischen naiven und Memory T Zellen (Sallusto *et al.*, 1999). CD45RA und CD45RO stellen Proteinprodukte verschiedener *Splice*-Varianten des CD45 Gens dar, wobei CD45RO vorrangig von Gedächtniszellen exprimiert wird (Terry *et al.*, 1988). Durch Miteinbeziehung des Markers CD28 lassen sich noch *transitional memory T cells* (TTM) abgrenzen. CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup> TTM sind weiter differenziert als TCM, jedoch nicht voll ausdifferenziert zu TEM.

Durch die Gabe von IL15 expandieren TEM und exprimieren wieder CD45RA und werden dann *terminal effector T cells* (TTE) oder auch TEMRA genannt. CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> TTE exprimieren auch zusätzlich Marker für Seneszenz wie KLRG1 und CD57 (Brenchley *et al.*, 2003; Henson *et al.*, 2009) und besitzen geringes Proliferationspotenzial und eine niedrige Effektorfunktion (Geginat *et al.*, 2003; Henson *et al.*, 2009).

## 1.4 Interaktionen von NK und T Zellen

NK Zellen sind als Immunabwehr gegen infizierte oder transformierte Zellen bekannt. Aktivierte NK Zellen können eine Reihe von Molekülen exprimieren, die eine Immunantwort verstärken oder aber auch eindämmen können. Wie in Tabelle 2 zusammengefasst, kann eine Interaktion zwischen NK und T Zelle entweder direkt über Zell-Zellkontakt stattfinden oder aber indirekt, wobei APCs involviert sind (Crouse *et al.*, 2015).

*In vitro* Experimente zeigten, dass humane NK Zellen die Reifung von DCs begünstigen, was durch den direkten Kontakt und produziertes IFN- $\gamma$  und TNF sichergestellt wurde. Des Weiteren konnte eine verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD86, CD83, CD80 und CCR7 auf DCs sowie eine gesteigerte IL12 Produktion beschrieben werden (Gerosa *et al.*, 2002). Experimente in Mäusen zeigten ebenfalls,

dass NK Zellen die Reifung von DCs fördern, indem NK Zellen nach Kontakt mit MHC-I<sup>low</sup> Tumorzellen IFN- $\gamma$  produzieren, welches zur Reifung von DCs führt. Diese wiederum produzierten IL12, was schließlich eine gesteigerte CD8<sup>+</sup> T Zell-Antwort gegenüber Tumorzellen bedingte (Mocikat *et al.*, 2003). In ähnlichen Maus-Experimenten mit A20 Tumorzellen konnten Adam *et al.* ebenfalls durch IFN- $\gamma$  Produktion von NK Zellen die IL12 Expression in DCs auslösen, was schließlich zu einer anti-Tumorantwort von CD8<sup>+</sup> T Zellen ohne die Hilfe von CD4<sup>+</sup> T Zellen führte (Adam *et al.*, 2005). Außerdem werden durch die NK Zell-vermittelte Lyse von Zielzellen Fragmente freigesetzt, welche wiederum CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Kreuzpräsentation durch DCs stärker aktivieren können (Krebs *et al.*, 2009). Somit tragen NK Zellen durch Sekretion von Cytokinen oder durch die Lyse von Zielzellen dazu bei, mittels DCs die CD8<sup>+</sup> T Zell Immunantwort einzuleiten.

**Tabelle 2 Übersicht möglicher Interaktion von NK und T Zellen.** Interferon (IFN); Interleukin (IL); Eigene Darstellung nach Crouse *et al.*, 2015 und André, unpublizierte Daten.

<b>Gesteigerte T Zellantwort durch NK Zellen</b>		
<b>Indirekter Kontakt</b>	IFN- $\gamma$ Produktion der NK Zellen fördert <i>in vivo</i> IL12 Produktion durch DCs, was zur gesteigerten CD8 <sup>+</sup> T Zellantwort führt	Mocikat, 2003
	IFN- $\gamma$ Produktion der NK Zellen fördert <i>in vivo</i> IL12 Produktion durch DCs, was zur CD4 <sup>+</sup> T Zell-unabhängigen CD8 <sup>+</sup> T Zellaktivität führt	Adam, 2005
	IFN- $\gamma$ und TNF fördern Reifung der DCs <i>in vitro</i> , was zur IL12 Produktion und verstärken Expression von kostimulatorischen Molekülen führt	Gerosa, 2002
	Antigenfreisetzung durch NK Zell-Lyse führt zu Kreuzpräsentation durch DCs und schlussendlich Aktivierung von CD8 <sup>+</sup> T Zellen	Krebs, 2005
<b>Direkter Kontakt</b>	IFN- $\gamma$ Produktion der NK Zellen fördert <i>in vivo</i> Differenzierung CD4 <sup>+</sup> T Zellen in Th1 Zellen	Martin-Fontecha, 2004
	Humane NK Zellen fördern Differenzierung von CD4 <sup>+</sup> T Zellen in Th1 Zellen durch IFN- $\gamma$ Produktion	Marondi, 2006
	Murine NK Zellen steigern Aktivität und Proliferation von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> Zellen durch 2B4/CD48 Interaktion	Assarsson, 2004
	Stimulation via NKG2D, CD16 oder KIR2DS2 humaner prä-aktivierter NK Zellen führt zur Proliferation und IFN- $\gamma$ Produktion CD4 <sup>+</sup> T Zellen durch B7 oder OX40L Interaktion	Zingoni, 2004
<b>Abgeschwächte T Zellantwort durch NK Zellen</b>		
<b>Indirekter Kontakt</b>	TRAIL- induzierter NK Zell vermittelter Prozess	Hayakawa, 2004
<b>Direkter Kontakt</b>	NK Zell vermittelte Lyse von CD8 <sup>+</sup> T Zellen	Soderquest, 2011
	NK Zell-vermittelte Lyse von CD4 <sup>+</sup> T Zellen	Lu, 2007
	Produktion von IL10 durch NK Zellen nach MCMV Infektion führt zur verminderten CD8 <sup>+</sup> T Zellantwort	Lee, 2009
	Lyse aktivierter T Zellen durch NK Zellen in Abhängigkeit der NKG2D/NKG2D-L Interaktion	Cerboni, 2007 Rabinovich, 2003
	Lyse aktivierter T Zellen durch NK Zellen in Abhängigkeit der Perforin Freisetzung	Ardonlino, 2011

NK Zellen können aber die T Zellimmunität auch auf direktem Wege durch Sekretion von Cytokinen oder durch cytotoxische Aktivität positiv beeinflussen. Die Injektion von Ovalbumin in Mäuse lässt NK Zellen in Lymphknoten einwandern und die Differenzierung CD4<sup>+</sup> T Zellen in Th1 Zellen durch sekretiertes IFN- $\gamma$  der NK Zellen fördern (Martin-Fontecha *et al.*, 2004). Ähnlich beeinflussen humane NK Zellen aus sekundärem lymphatischem Gewebe Th1 Zellen: Durch eine stärkere IFN- $\gamma$  Sekretion tonsillärer NK Zellen, verglichen mit NK Zellen aus dem peripheren Blut, kommt es zu einer erhöhten Th1 Polarisation (Morandi *et al.*, 2006). Des Weiteren konnten Laouar *et al.* nicht nur zeigen, dass IFN- $\gamma$  die Differenzierung in Th1 Zellen begünstigt, sondern auch dass sekretiertes TGF- $\beta$  die IFN- $\gamma$  Produktion durch NK Zellen kontrolliert und schließlich auch die Th1 Differenzierung reguliert. (Laouar *et al.*, 2005). Die Arbeitsgruppe um Chambers konnte außerdem belegen, dass murine NK Zellen die Aktivität und Proliferation von anti-CD3 und Antigen-stimulierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen steigern können. Diese Interaktion ist von der Bindung durch 2B4 (CD244) auf NK Zellen und CD48 auf T Zellen abhängig (Assarsson *et al.*, 2004). Die Stimulation via NKG2D, CD16 oder KIR2DS2 humaner NK Zellen, welche zuvor mit IL2, IL12 oder IL15 aktiviert wurden, führt zur Proliferation und IFN- $\gamma$  Produktion von autologen CD4<sup>+</sup> T Zellen. Dieser Effekt ist von der B7 und OX40 Liganden Expression auf aktivierten NK Zellen abhängig (Zingoni *et al.*, 2004).

Im Gegensatz dazu können direkte Interaktionen zwischen NK und T Zellen die folgende Immunreaktion jedoch auch abschwächen. Sekretierte Cytokine, aber auch die Lyse anderer Immunzellen spielt hier eine Rolle. Durch MCMV-Infektion produzieren murine NK Zellen IL10, was zu einer reduzierten T Zellimmunität führt (Lee *et al.*, 2009). Die negative Regulation von T Zellantworten beinhaltet außerdem die direkte Lyse von T Zellen. Drei unterschiedliche Forschergruppen konnten zeigen, dass aktivierte T Zellen durch NK Zellen lysiert werden, in Abhängigkeit der NKG2D/NKG2D-L Interaktion und Freisetzung von Perforin (Ardolino *et al.*, 2011; Cerboni *et al.*, 2007; Rabinovich *et al.*, 2003). Immunisierung von Mäusen mit Ovalbumin führte ebenfalls zur Lyse von CD8<sup>+</sup> T Zellen in Abhängigkeit von NKG2D und Perforin (Soderquest *et al.*, 2011). Ähnlich hierzu wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen durch NK Zellen lysiert, welchen der inhibitorische Ligand Qa-1 fehlte (Lu *et al.*, 2007). Neben der direkten T Zell-Lyse konnte von Olson und Kollegen auch die Induktion der T Zell-Apoptose nachgewiesen werden (Olson *et al.*, 2007). Eine Inhibierung der T Zellproliferation durch NK Zellen konnten Trivedi *et al.* in Zusammenhang mit einer p21-vermittelten Inhibierung belegen. Der Zellzyklus-Inhibitor p21 induzierte hier eine Akkumulation der T Zellen in der G0/G1 Phase (Trivedi *et al.*, 2005).

Des Weiteren können NK Zellen T Zellen wiederum indirekt negativ beeinflussen. Hierzu zählt die Lyse von unreifen DCs durch den TRAIL-Rezeptor. Eine Depletion der NK Zellen

oder Blockade des TRAIL-Rezeptors steigerte die Aktivität von CTLs wieder (Hayakawa *et al.*, 2004).

## 1.5 Akute kindliche Leukämien

Bei Leukämien handelt es sich um eine maligne Transformation der Lymphozyten des hämatopoetischen Systems während ihrer Differenzierung im Knochenmark. Sie können aufgrund des Krankheitsverlaufs in akute und chronische Leukämien unterschieden werden und je nach Ursprung der malignen Zellen der myeloischen oder lymphatischen Reihe zugeordnet werden (Murphy *et al.*, 2012)

Die akute lymphatische Leukämie (ALL) und die akute myeloische Leukämie (AML) machen ungefähr ein Drittel aller Krebserkrankungen bei Kindern aus (Annesley *et al.*, 2015), wobei ALL die häufigste Krebserkrankung bei Kindern, vor allem zwischen dem zweiten und fünften Lebensjahr, darstellt (Kato *et al.*, 2018; Schrappe *et al.*, 2018). Wie auch bei der AML können als Ursache bei der ALL viele unterschiedliche genetische Veränderungen vorliegen, welche die Zell-Vorläuferentwicklung verhindern und zu anormaler Proliferation und Überleben der Zelle führen (Ghazavi *et al.*, 2015; Hunger *et al.*, 2015; Pui *et al.*, 2012). Diese genetischen Veränderungen sind beispielsweise Aneuploidie, chromosomale Neuordnung mit resultierender veränderter Genexpression, Deletionen und DNA Mutationen (Harrison, 2009; Hunger *et al.*, 2015). Prinzipiell wird ALL in T Zell-Vorläufer, B Zell-Vorläufer oder B Zell-ALL charakterisiert. Basierend hierauf werden anhand des Karyotyps weitere Subtypen unterschieden (Pui *et al.*, 2012). Durch diese Vielzahl an Ursachen werden diese Subtypen auch unterschiedlich behandelt (Eswaran *et al.*, 2015).

Durch Verbesserungen in der Behandlung und im Patientenmanagement konnte die Überlebensrate bei ALL deutlich auf über 80 % bei Kindern gesteigert werden (Moorman, 2012). Darüber hinaus kann ALL auch bei Erwachsenen auftreten, jedoch mit wesentlich schlechteren Heilungschancen von etwa 40 % (Ghazavi *et al.*, 2015). Bis zu 20 % der Kinder mit ALL sind gegenüber den Behandlungen refraktär und die Überlebensrate für ein Rezidiv ist weiterhin gering. Auch wenn die Mehrheit der Kinder mit AML eine vollständige Remission der Leukämie erreicht, sind weniger als 60 % langfristig überlebensfähig (Annesley *et al.*, 2015).

Durch die entartete Proliferation der Leukämiezellen werden andere funktionsfähige Immunzellen verdrängt. Die Folge sind hohes Fieber, Blutungsneigung, Knochen- und Gelenkschmerzen sowie Abgeschlagenheit und Blässe (Schrappe *et al.*, 2018).

Während der Leukämie-Therapie wird versucht die malignen Zellen im Knochenmark des Patienten, durch eine Kombination aus Bestrahlung und cytotoxischer Chemotherapie zu eliminieren (Murphy *et al.*, 2012). Im Anschluss erfolgt bei Hochrisikopatienten eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (*hematopoetic stemcell transplantaion*, HSCT) bei der Stammzellen eines Spenders auf den Empfänger übertragen werden und so das erkrankte Knochenmark ersetzt wird.

## 1.6 Zielsetzung

Das immunologische Gedächtnis ist normalerweise eine Eigenschaft des adaptiven Immunsystems. Jüngere Studien zeigen jedoch, dass diese Gedächtnis-ähnliche Eigenschaft auch für NK Zellen nachweisbar sind. In der vorliegenden Arbeit soll deshalb eine Gedächtnis-ähnliche Funktion für NK Zellen nach Tumorkontakt beschrieben und verifiziert werden. Darüber hinaus soll der Mechanismus der Konvertierung von Effektor-NK Zellen in Gedächtnis-ähnliche NK Zellen genauer untersucht werden. Hierbei liegt der Fokus auf der Bedeutung des Zellkontakts während des Primingprozesses, dem Cytokinmilieu und der Beteiligung der NKG2D/IL15 Achse bei der Konvertierung in Tumor-induzierte Memory-like NK Zellen.

NK Zellen sind nicht nur wichtige Effektorlymphozyten des angeborenen Immunsystems und bekämpfen virusinfizierte sowie maligne Zellen. Sie sind auch wichtige immunregulatorische Zellen, die in der Lage sind, adaptive Immunantworten zu beeinflussen. Daher soll in einem weiteren Teil dieser vorliegenden Arbeit die immunregulatorische Wirkung der Gedächtnis-ähnlichen NK Zellen auf andere Zellen des Immunsystems, v.a. aber auf T Zellen, beschrieben und mit naiven NK Zellen verglichen werden.

Letztlich zielen diese Ergebnisse darauf hin, den adoptiven NK Zell Transfer für kindliche Patienten mit akuter Leukämie mit ungünstiger Prognose zu optimieren und einen klinischen Einsatz zu ermöglichen.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Tabelle 3 Geräte sowie deren Hersteller

Gerätebezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer BD LSRII	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD Canto	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
„The Big Easy“ EasySep™ Magnet	STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanda
EasySep™ Violet Magnet	STEMCELL Technologies, Vancouver, Kanda
Gel-System	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
Inkubator HERA Cell	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Inversmikroskop Olympus IX50	Olympus Europa SE & Co. KG, Hamburg, Deutschland
Kompaktwaage EMB-1200-1	Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotixa 50RS	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
Odyssey Fc Imaging System	LI-COR Biotechnology GmbH, Bad Homburg, Deutschland
PCR System GeneAmp 9700	Applied Biosystems Deutschland GmbH
Power Pac 1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Pipettensatz	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettensatz	Gilson, Inc., Middleton, WI, USA
Pipettensatz	Abimed GmbH, Langenfeld, Deutschland
Pipetboy 2	Integra Biosciences GmbH, Biebertal, Deutschland
Sterilbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Tischzentrifuge Hettich Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Sonifier Cell Disruptor B12	Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut, USA
Vortexer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Wasserbad No. 1012	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Zählkammer Neubauer <i>Improved</i>	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
Zell-bestrahlungsgerät GammaCell 1000 Elite	MDS-Nordion Inc., Ottawa, Kanada

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller

Produkt	Hersteller
FACS Röhrchen	Corning Inc., Corning, New York, USA
Kryoröhrchen	Corning Inc., Corning, New York, USA
Parafilm	American National Can Group, Chicago, Illinois, USA
Pasteur-Pipetten	WU Mainz, Deutschland
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KG, Nürnbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß, 25 und 50 ml	Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich
Reaktionsgefäß, Safe-Lock, div. Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Serologische Pipetten, div. Größen	Corning Inc., Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen	Corning Inc., Corning, New York, USA
Zellkulturplatten	Corning Inc., Corning, New York, USA
Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Kremismünster, Österreich

## 2.3 Software

Tabelle 5 Software sowie verwendete Version und Hersteller

Software	Version	Hersteller
BD FACS Diva™	6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Diva™	8	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CorelDRAW	X7	Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Kanada
EndNote	X 8.1	Thomas Reuters, New York City, USA
FCS Express	4	DeNovo Software, Glendale, CA, USA
FlowJo	10	FlowJo, LLC, Ashland, Oregon, USA
GraphPad Prism	Prism 6	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
LEGENDplex™ Software	8.0	BioLegend, San Diego, CA, USA
Microsoft Office	2010	Albuquerque, New Mexcio, USA

## 2.4 Reagenzien

Tabelle 6 Reagenzien sowie deren Bezug

Medien/Puffer/Lösungen	Bezug
Bicoll (Ficoll)	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Natrium- EDTA-Lösung 250 mM, pH 8,0	Universitäts-Apotheke, Tübingen, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gel Loading Dye Blue 6x	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA

Humanalbumin 50 g/l, Alburex5	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Humanes IgG (100 mg/ml), privigen	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Humanserum "Off the Clot" AB (HuS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
L-Glutamine 200 mM (L-Glut)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Low MW Ladder	New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA
RPMI-Medium1640	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Biochrom, Berlin, Deutschland
10x Rotiphorese TBE-Puffer	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA

## 2.5 Medien und Puffer

**Tabelle 7 Medien und Puffer sowie deren Zusammensetzung**

Medien/Puffer	Zusammensetzung
Blockierpuffer	Humanes IgG in FACS-Puffer (Endkonz. 10 µg/ml)
EasySep-Puffer	10 ml FCS 1 ml 250 mM EDTA in 500 ml PBS
Einfriermedium	80 % Humanalbumin 50 g/l 20% DMSO
FACS-Puffer	10 ml FCS 4,2 ml 250 mM EDTA in 500 ml PBS
RPMI + 10 % FCS	10 % FCS 1 % L-Glut 1 % Pen/Strep in 500 ml RPMI 1640
RPMI + 20 % FCS	20 % FCS 1 % L-Glut 1 % Pen/Strep in 500 ml RPMI 1640
RPMI + 10 % HuS	10 % FCS 10 % HuS 1 % L-Glut 1 % Pen/Strep in 500 ml RPMI 1640

## 2.6 Zelllinien/primäre Leukämien

Die primären Leukämiezellen (Tabelle 8) stammen aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin in Tübingen. Die Zellspenden erfolgten mit Genehmigungen der lokalen Ethikkommission mit folgenden Projekt-Nummern an PD Dr. Dr. Maya C. André: 23/2007, 199/2010BO1, 154/2012BO1, 29/2013BO1 und 213/2014BO2.

**Tabelle 8 Zelllinien/primäre Leukämien mit Eigenschaften und deren Bezug**

	<b>Eigenschaften</b>	<b>Bezug</b>
Nalm-16	Leukämiezelllinie aus B-Zell Vorläufern (BCP). Etabliert 1977 aus peripherem Blut einer 12-jährigen weiblichen Patientin mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL). (Kohno et al., 1980)	AG Lengerke Prof. Dr. C. Lengerke, Universitätsklinik Basel
P3B	Anonymisierte primäre BCP-ALL-Probe einer 6-jährigen, weiblichen Patientin mit zweitem Rezidiv	Patientenprobe Kinderklinik Tübingen Erhalten: August 2013
P18R	Anonymisierte primäre AML-Probe einer 1-jährigen, weiblichen Patientin	Patientenprobe Kinderklinik Tübingen
P84D	Anonymisierte primäre AML-Probe einer 14-jährigen, weiblichen Patientin	Patientenprobe Kinderklinik Tübingen Erhalten: August 2013

## 2.7 Farbstoffe

**Tabelle 9 Farbstoffe sowie deren Bezug**

<b>Farbstoffe</b>	<b>Bezug</b>
CellTrace™ CFSE	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Pacific Blue Succinimidyl Ester	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Zombie-Aqua Fixable Viability Kit	BioLegend, San Diego, CA, USA
AF350 Succinimidyl Ester	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA

## 2.8 Antikörper und Isotypen

**Tabelle 10 Antikörper mit Isotyp sowie deren gekoppeltes Fluorochrom, Verdünnung, Klon und Bezug**

<b>Antikörper</b>	<b>Fluorochrom</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Klon</b>	<b>Bezug</b>	<b>Isotyp</b>
$\alpha$ -CD 3	PerCP	1:100	SK7	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 3	PE CF594	1:50	UCHT1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 3	-	1:1000	HIT3a	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG2a
$\alpha$ -CD 4	PerCP	1:100	SK3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 4	FITC	1:10	SK3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 8	APC-H7	1:10	SK1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1

$\alpha$ -CD 10	PE CF594	1:50	HI10A	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 16	AF700	1:50	3G8	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 19	APC	1:50	SJ25C1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 25	FITC	1:10	2A3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 25	BV605	1:28,6	2A3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 28	PE/Dazzle594	1:20	CD28.2	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -CD 45RO	PE-Cy7	1:20	UCHL1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 54 (ICAM-1)	FITC	1:5	84H10	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -CD 56	BV421	1:50	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -CD 56	BV711	1:25	HCD56	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -CD 56	BUV395	1:12,5	NCAM16.2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG2b
$\alpha$ -CD 57	PE	1:20	NK-1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgM
$\alpha$ -CD 112	PE	1:50	TX31	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -CD 155	PE	1:20	SKII.4	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -CXCR6 (CD186)	BV421	1:20	K041E5	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG2a
$\alpha$ -CCR7 (CD197)	AF700	1:20	G043H7	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG2a
$\alpha$ -FoxP3	AF647	1:12,5	259D	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -KLRG1	AF647	1:100	13F12F2	eBioscience GmbH, Frankfurt, Deutschland	IgG2a
$\alpha$ -NKG2C (CD159c)	PerCP	1:10	134591	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	IgG1
$\alpha$ -NKG2D (CD 314)	APC	1:25	BAT221	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	IgG1

## Material

$\alpha$ -NKG2D (CD 314)	PE-Vio770	1:25	BAT221	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -NKG2D (CD 314)	-	20 $\mu$ g/ml	1D11	BioLegend, San Diego, CA, USA	IgG1
$\alpha$ -NKp30 (CD 337)	BV510	1:12,5	P30-15	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -NKp46 (CD 335)	BV605	1:12,5	9E2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	IgG1
$\alpha$ -MIC-A	-	1:100	AMO1	Prof. Dr. A. Steinle, Universität Frankfurt	IgG1
$\alpha$ -MIC-B	-	1:50	BMO1	Prof. Dr. A. Steinle, Universität Frankfurt	IgG1
$\alpha$ -ULBP1	-	1:100	AUMO3	Prof. Dr. A. Steinle, Universität Frankfurt	IgG1
$\alpha$ -ULBP2	-	1:100	BUMO1	Prof. Dr. A. Steinle, Universität Frankfurt	IgG1
$\alpha$ -ULBP3	-	1:100	CUMO3	Prof. Dr. A. Steinle, Universität Frankfurt	IgG1
sheep $\alpha$ -mouse IgG	PE	1:50	P8547	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA	-
$\alpha$ -HLA-A,B,C	PE	1:50	W6/32	BioLegend, San Diego, Californien, USA	IgG2a
$\alpha$ -HLA-E	-	1:25	MEM-E/08	Abcam, Cambridge, England	IgG1

## 2.9 Interleukine

Tabelle 11 Interleukine sowie deren Bezug

Interleukine	Bezug
IL2 (2000 U/ $\mu$ l)	Novartis, Basel, Schweiz
IL12 (0,2 mg/ml)	PeproTech, Hamburg, Deutschland
IL15 (50 $\mu$ g/ml)	CellGenix, Freiburg, Deutschland
IL18 (50 ng/ $\mu$ l)	MBL, Nagoya, Japan

## 2.10 Kits

**Tabelle 12 Verwendete Kits mit Eigenschaft sowie deren Bezug**

<b>Kit</b>	<b>Firma/Bezug</b>	<b>Zielmolekül</b>
EasySep Human CD3 Positive Selection Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich	CD3
EasySep Human CD56 Positive Selection Kit II	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich	CD56
EasySep Human NK Cell Enrichment Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich	CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, HLA-DR
EasySep Human NK Cell Enrichment Kit II	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich	CD3, CD4, CD14, CD19, CD20, HLA-DR
LEGENDPlex Human CD8/NK Panel 13-plex	BioLegend, San Diego, CA, USA	IL2, IL4, IL10, IL6, IL17A, TNF- $\alpha$ , sFas, sFasL, IFN- $\gamma$ , Granzym-A, Granzym-B, Perforin, Granulysin
Intracellular Fixation & Permeabilization Buffer Set	eBioscience GmbH, Frankfurt, Deutschland	Zellen zur Fixierung & Permeabilisierung

### 3 Methoden

Alle Experimente wurden in einem standardisierten Labor der Sicherheitsstufe S1 durchgeführt.

#### 3.1 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Humane Vollblutspenden wurden durch die klinische Transfusionsmedizin ZKT Tübingen bereitgestellt. Für die Isolation von mononukleären Zellen (PBMCs) wurde von verschiedenen anonymisierten Spendern das Blut entweder 1:1 mit RT-warmem PBS verdünnt oder unverdünnt auf Ficoll geschichtet. Nach der Zentrifugation bei 500 g für 25 min ohne Bremse und Beschleunigung wurden so die Erythrozyten durch den entstehenden Dichtegradienten abgetrennt. Die PBMCs konnten anschließend vorsichtig aus der Interphase pipettiert und mit PBS bei 350 g für 10 min gewaschen werden. Die gewonnenen PBMCs wurden gezählt (Kapitel 3.2) und für die Isolation verschiedener Zelltypen vorbereitet (Kapitel 3.5 und 3.6).

#### 3.2 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe einer Neubauer *improved* Zählkammer. Hierfür wurde die Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt und in die Kammer gegeben. Die Anzahl der ungefärbten und somit lebenden Zellen in den vier Großquadraten wurde unter dem Mikroskop (10x Vergrößerung) im Phasenkontrast bestimmt. Die gezählten Zellen wurden durch die Anzahl der Großquadrate geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor sowie dem Zählkammerfaktor  $10^4$  multipliziert, um die Zellkonzentration der Probe zu ermitteln:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{ausgezählte Zellen}}{\text{Anzahl Großquadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zählkammerfaktor } 10^4$$

#### 3.3 Einfrieren von Zellen

Zellen können mittels Kryokonservierung unter Aufrechterhaltung der Vitalität gelagert werden. Hierfür wurden Zellen gezählt und in jeweils 0,5 ml vorgekühltem Einfriermedium und 0,5 ml Zellkulturmedium aufgenommen. 1 ml dieser Zellsuspension wurde in ein Kryoröhrchen überführt und in einem Mr. Frosty üN bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur

Langzeitlagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff transferiert. Bis zu  $50 \times 10^6$  Zellen können so pro Kryoröhrchen aufbewahrt und gelagert werden.

### 3.4 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C solange erwärmt, bis nur noch ein kleines Stück Eis übrig war. Die 1 ml Zellsuspension wurde anschließend in 9 ml zimmerwarmes RPMI + 10 % FCS transferiert und das Kryoröhrchen mit 1 ml Medium nachgespült. Nach Zentrifugation mit 350 g für 10 min wurden die Zellen gezählt und in dem entsprechend warmen Medium aufgenommen.

### 3.5 Isolation primärer NK Zellen

NK Zellen wurden aus frisch isolierten PBMCs (Kapitel 3.1) über eine säulenfreie, magnetische Zellseparation mit Hilfe des *EasySep Human NK Enrichmentkits* nach Herstellerangaben negativ aufgereinigt. Hierfür wurden PBMCs auf  $50 \times 10^6$ /ml mit *EasySep* Puffer eingestellt und für 10 min mit 50 µl/ml *Enrichment Cocktail* versetzt. In diesem Schritt werden über ihre Oberflächenmoleküle alle CD56<sup>-</sup> Zellen mit einem tetrameren Antikörperkomplex markiert. Danach wurde der Zellsuspension 100 µl/ml *Magnetic Particles* zugegeben, damit die markierten Zellen an magnetische *Beads* gekoppelt werden. Nach einer Inkubation von 5 min wurde die Zellsuspension auf 10 ml mit *EasySep* Puffer aufgefüllt und für 2,5 min im *Big Easy* Magneten platziert. Beim Abkippen der Zellsuspension werden so alle CD56<sup>-</sup> Zellen im Magneten über die gekoppelten magnetischen *Beads* zurückgehalten und nur die unmarkierten CD56<sup>+</sup> Zellen isoliert. Die erhaltene CD56<sup>+</sup> Fraktion wurde mit PBS bei 350 g für 10 min gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Isolation wurde die Reinheit der CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Fraktion bestimmt (Kapitel 3.17.2.1).

### 3.6 Depletion von NK Zellen

Zur Depletion von NK Zellen aus frisch isolierten PBMCs wurde das *EasySep CD56 Positive Selection Kit* nach Herstellerangaben verwendet, um NK Zellen über eine säulenfreie, magnetische Isolation aus der Zellsuspension zu entfernen. Hierfür wurden PBMCs auf  $1 \times 10^8$ /ml mit *EasySep* Puffer eingestellt und für 3 min mit 100 µl/ml *EasySep Selection Cocktail* versetzt. So werden NK Zellen über das spezifische Oberflächenmolekül CD56 mit einem tetrameren Antikörperkomplex markiert. Im nächsten

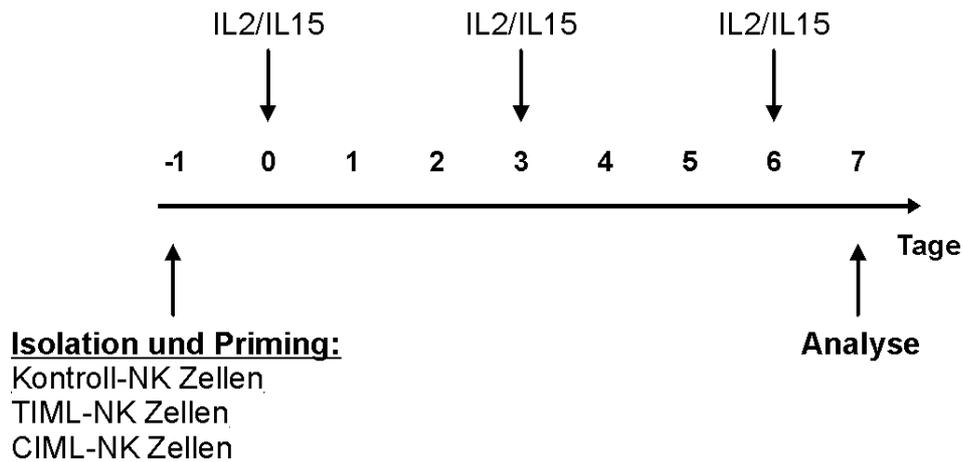
Schritt wurden 100  $\mu\text{l/ml}$  der magnetischen *RapidSpheres* zugegeben, welche den Antikörperkomplex der markierten Zellen erkennen und binden. Nach einer Inkubation von 3 min wurde die Zellsuspension auf 5 ml mit *EasySep* Puffer aufgefüllt und für 3 min im *Big Easy* Magneten platziert. Beim Abschütten der Zellsuspension werden die markierten  $\text{CD56}^+$  NK Zellen im Magneten über ihre gekoppelten magnetischen Partikel zurückgehalten und die NK Zellen so aus der Zellsuspension entfernt. Die erhaltene  $\text{CD56}^-$  Fraktion wurde mit PBS bei 350 g für 10 min gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Depletion wurde die Frequenz der NK Zellen in der isolierten Fraktion bestimmt (Kapitel 3.17.2.1). Bis zur weiteren Verwendung der Zellen wurden diese kryokonserviert und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert (Kapitel 3.3).

### **3.7 Depletion von T Zellen**

Zur Depletion von T Zellen aus kultivierten, primären NK Zellen wurde das *EasySep CD3 Positive Selection Kit* nach Herstellerangaben verwendet, um T Zellen über eine säulenfreie, magnetische Isolation aus der Zellsuspension zu entfernen. Hierfür wurden die primären NK Zellen auf  $1 \times 10^8/\text{ml}$ , mindestens jedoch in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  aufgenommen, mit *EasySep* Puffer eingestellt und für 15 min mit 100  $\mu\text{l/ml}$  *EasySep Selection Cocktail* versetzt. So werden T Zellen über das spezifische Oberflächenmolekül CD3 mit einem tetrameren Antikörperkomplex markiert. Im nächsten Schritt wurden 100  $\mu\text{l/ml}$  der magnetischen *RapidSpheres* zugegeben, welche den Antikörperkomplex der markierten NK Zellen erkennen und binden. Nach einer Inkubation von 3 min wurde die Zellsuspension auf 5 ml mit *EasySep* Puffer aufgefüllt und für 3 min im *EasySep* Magneten platziert. Beim Abschütten der Zellsuspension werden die markierten  $\text{CD3}^+$  T Zellen im Magneten zurückgehalten und die T Zellen so aus den kultivierten NK Zellen entfernt. Die erhaltene  $\text{CD3}^-$  Fraktion wurde mit PBS bei 350 g für 10 min gewaschen und anschließend die Zellzahl bestimmt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Depletion wurde die Frequenz der  $\text{CD56}^+\text{CD3}^-$  Fraktion bestimmt (Kapitel 3.17.2.1).

### **3.8 Generierung von Memory-like NK Zellen**

Die Konvertierung von naiven NK Zellen in Tumor-induzierte Memory-like (TIML-) bzw. Cytokin-induzierte Memory-like (CIML-) NK Zellen erfolgte nach dem Schema aus Abbildung 3.



**Abbildung 3 Übersicht Kulturmodell zur Generierung von Memory-like NK Zellen.** Es ist das experimentelle Layout zur Generierung von TIML- und CIML NK Zellen abgebildet. Nach Isolation von NK Zellen an Tag -1 werden diese mit bestrahlten Tumorzellen (Generierung von TIML-NK Zellen) oder IL12/18 (Generierung von CIML-NK Zellen) für 8 Tage kokultiviert. Alle Ansätze werden an Tag 0, 3 und 6 mit IL2 und IL15 versorgt, um das Überleben der NK Zellen sicherzustellen.

Für die Generierung von TIML-NK Zellen wurden Tumorzellen mit 100 Gy bestrahlt und mit isolierten, primären NK Zellen (Kapitel 3.5) an Tag -1 der Kultur im Verhältnis 3:1 (Tumorzellen:NK Zellen) versetzt. Zur Generierung von CIML-NK Zellen erfolgte die Kultivierung isolierter, primärer NK Zellen (Kapitel 3.5) an Tag -1 der Kultur für 16 h mit 10 ng/ml IL12 und 50 ng/ml IL18 (Romee *et al.*, 2012). Alle Priming-Ansätze, die naiven, TIML- und CIML-NK Zellen, wurden auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit IL2 (100 U/ml) und IL15 (1 ng/ml) bei 37 °C im Brutschrank kultiviert.

Nach 16 h wurden alle Primingansätze dreimal mit 3 ml RPMI + 10 % FCS bei 350 g für 10 min gewaschen, um die Cytokine IL12 und IL18 aus der Kultur zu entfernen. Danach wurden die Zellen erneut in RPMI + 10 % HuS aufgenommen und mit IL2 und IL15 versorgt.

An Tag 3 der Kultur wurden die Primingansätze gezählt und erneut auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit den Cytokinen IL2 und IL15 versorgt.

An Tag 6 erfolgte zur Überprüfung der Reinheit der NK Zellkultur eine  $CD56^+CD3^-$  Frequenzmessung (Kapitel 3.17.2.1). Lag die Frequenz der  $CD3^+$  T Zellen über 3 %, wurden die T Zellen aus der Kultur depletiert (Kapitel 3.7), andernfalls wurde ein Mediumwechsel bei allen Priming-Ansätzen durchgeführt, die Ansätze wieder auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit den Cytokinen IL2 und IL15 versorgt.

### **3.9 Isolation von membranständigen Proteinen**

Um zu überprüfen, welche Rolle die Oberflächenrezeptoren der Tumorzellen während des Primings der NK Zellen spielen, wurden die Tumorzellen lysiert und die Membranfragmente mit ihren membranständigen Proteinen an Tag -1 für das Priming verwendet.

Hierfür wurde die, im Vergleich zur Anzahl an später kultivierten NK Zellen, dreifache Menge an Tumorzellen Nalm-16 mit einem Proteaseinhibitor nach Herstellerangaben behandelt und anschließend durch zwei Einfrier-Auftau-Zyklen (-80 °C zu 37 °C) aufgeschlossen (North *et al.*, 2007). Durch die Zugabe von 30 µg DNase I pro  $1 \times 10^6$  Nalm-16 Zellen in einem Endvolumen von 100 µl PBS für 1 Std bei 37 °C wurde die genomische DNA verdaut. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 14.000 g für 15 min erfolgte die Trennung löslicher Proteine aus dem Cytosol von den Membranfragmenten und ihren Proteinen. Das Pellet mit den membranständigen Proteinen wurde in 1 ml PBS gelöst und mit einer Ultraschallsonde bei 180 Watt für 1 min behandelt, um Aggregationen zu vermeiden. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 14.000 g für 15 min wurden die isolierten, membranständigen Proteine im Pellet zu den zu kultivierenden NK Zellen gegeben und wie bereits beschrieben in Kultur genommen (Kapitel 3.8).

Als positive Kontrolle wurden in diesem Versuch auch TIML-NK Zellen mit Nalm-16 generiert (Kapitel 3.8).

### **3.10 Blockade von NKG2D auf NK Zellen**

Zur Untersuchung der Beteiligung des NK Zellrezeptors NKG2D bei der Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen, wurde mittels Antikörperzugabe der Rezeptor so blockiert, dass dieser während des Primings gebunden, jedoch im abschließenden Cytotoxizitätstest an Tag 7 wieder frei und funktionell war.

Für diesen Versuch wurden NK Zellen zunächst aus Vollblut isoliert (Kapitel 3.1 und 3.5) und anschließend mit 20 µg/ml NKG2D für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach Überprüfung der erfolgreichen Blockade (Kapitel 3.17.2.3) wurden die blockierten NK Zellen für das Priming mit zuvor 100 Gy bestrahlten Leukämiezellen verwendet. Unstimulierte, blockierte NK Zellen dienten als Kontrolle, um einen möglichen Einfluss des Blockade-Antikörpers während der Kultur zu untersuchen. Als Positivkontrolle wurden unblockierte NK Zellen desselben Spenders verwendet und ebenfalls für das Priming mit zuvor bestrahlten Leukämiezellen verwendet. Alle Ansätze wurden auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 %

HuS eingestellt und mit 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15 versorgt. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Brutschrank.

An Tag 3 der Kultur wurden die Primingansätze gezählt und erneut auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS aufgenommen und mit den Cytokinen IL2 und IL15 versorgt.

An Tag 6 wurde die Reinheit der NK Zellen in allen Primingansätzen mit einer  $CD56^+CD3^-$  Frequenzmessung (Kapitel 3.17.2.1) überprüft. Lag die Frequenz der  $CD3^+$  T Zellen über 3 %, wurden diese aus der Zellkultur mittels CD3 Depletion entfernt (Kapitel 3.7). Konnte auf eine Depletion von T Zellen verzichtet werden, wurde ein Mediumwechsel bei allen Ansätzen durchgeführt, diese wieder auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15 versorgt.

Da die Funktionalität der NK Zellen an Tag 7 der Kultur in einem Cytotoxizitätstest gemessen wurde und hierfür der NKG2D Rezeptor wieder frei und funktionell vorliegen sollte, wurde eine Färbung des Rezeptors NKG2D aller Ansätze durchgeführt (Kapitel 3.17.2.3), durchflusszytometrisch analysiert und untereinander verglichen.

### 3.11 Transwell-Experimente

Bei den Transwell-Experimenten sollte der Zellkontakt zwischen NK Zellen und Tumorzellen verhindert werden. Die NK Zellen wurden aus PBMCs an Tag -1 wie gewohnt isoliert (Kapitel 3.1 und 3.5), auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und in eine Zellkulturplatte gegeben. In die *wells* wurden dann Transwell-Einsätze eingehängt, die bestrahlte Tumorzellen (100 Gy) im Verhältnis 1:3 (NK Zellen: Tumorzellen) enthielten. Die Transwell-Einsätze hatten eine Porengröße von 0,4  $\mu\text{m}$  und eine Porendichte von  $2 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$ , sodass ein Zellkontakt verhindert wird, aber der Austausch von sekretierten Cytokinen möglich ist. Für die CIML-NK Zellen erfolgte eine Stimulation mit 10 ng/ml IL12 und 50 ng/ml IL18 für 16 h. In diesen Ansatz wurden ebenfalls Transwell-Einsätze gegeben, welche mit dem gleichen Volumen an RPMI + 10 % HuS wie bei den TIML-NK Zellen gefüllt waren. Ebenfalls wurden unstimulierte NK Zellen mit Transwell-Einsätzen als Negativkontrolle kultiviert. Die Versorgung aller Ansätze erfolgte mit 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15. Die Priming-Ansätze wurden nach 16 h dreimal mit RPMI + 10 % FCS gewaschen, um die Cytokine IL12 und IL18 aus der Kultur zu entfernen. Hierbei wurden bei den Tumor-geprimten NK Zellen die NK Zellen und die Tumorzellen aus dem Insert getrennt zentrifugiert. Danach wurden die Zellen erneut in RPMI + 10 % HuS aufgenommen, in neue Einsätze überführt und mit IL2 und IL15 versorgt. Des Weiteren sollte eine CD19 Färbung (Kapitel 3.17.2.4) sicherstellen,

dass keine Tumorzelle aus dem Transwell-Einsatz in das *well* mit den kultivierten NK Zellen gelangt.

An Tag 3 der Kultur wurden die Primingansätze gezählt und erneut auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit Cytokinen IL2 und IL15 versorgt, wobei immer das Volumen in den jeweiligen Transwell-Einsätzen miteinberechnet wurde.

An Tag 6 erfolgte zur Überprüfung der Reinheit der NK Zellkultur eine  $CD56^+CD3^-$  Frequenzmessung (Kapitel 3.17.2.1). Lag die Frequenz der  $CD3^+$  T Zellen über 3 %, wurden die T Zellen aus der Kultur depletiert (Kapitel 3.7), andernfalls wurde ein Mediumwechsel bei allen Priming-Ansätzen durchgeführt, diese wieder auf  $3 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit den Cytokinen IL2 und IL15 versorgt. Hierbei wurden neue Einsätze für alle Ansätze verwendet.

### 3.12 Cytokin-Messungen im Überstand

Zur Analyse des Cytokinmilieus während des Primings von TIML und CIML-NK Zellen wurden jeweils 100  $\mu$ l aus der Kultur der Primingansätze an den Tagen 0, 4, 6 und 7 entnommen. Die entnommenen Überstände wurden anschließend abzentrifugiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt, um eventuell verbleibende Zellen zu entfernen und nicht in die Analyse einzubeziehen. Als Kontrolle dienten mit 100 Gy bestrahlte Tumorzellen in RPMI + 10 % HuS als auch allein das Medium RPMI + 10 % HuS mit den Cytokinen IL2 (100 U/ml) und IL15 (1 ng/ml), um die Menge an Hintergrundsignal zu identifizieren. Bis zur Analyse wurden die Überstände bei -80 °C gelagert.

Die FACS-basierte Analyse aller gesammelten Überstände erfolgte mit dem Legendplex *Human CD8/NK Panel* laut Herstellerangaben. Dies ermöglicht die parallele Quantifizierung von bis zu 13 verschiedenen Analyten in der Probe.

Nachdem 10  $\mu$ l des Assay-Puffers in alle *wells* einer 96-*well* V-Form vorgelegt und 10  $\mu$ l der Probe bzw. des verdünnten Standards sowie 10  $\mu$ l der gut resuspendierten *Beads* und des *Detection* Antikörpers hinzugegeben wurde, wurde die Platte abgedeckt und für 2 Std bei 1.000 rpm bei RT gleichmäßig geschüttelt. In diesem Schritt bindet das Gemisch an Antikörper gekoppelte *Beads* spezifisch an ihr jeweiliges Analyt.

Ohne Waschschrift wurden 10  $\mu$ l Streptavidin-PE pro *well* hinzugegeben und die Platte erneut für 30 min bei 1.000 rpm bei RT gleichmäßig, lichtgeschützt geschüttelt. Dadurch, dass Streptavidin-PE an die Detektionsantikörper bindet, kann so durch das Fluoreszenz-Signal in PE ein Verhältnis zur gebundenen Menge an Analyt gebildet werden. Durch die

spezifische Größe der *Beads* kann dann ein quantitativer Rückschluss auf bis zu 13 verschiedene Analyte in einer Probe gezogen werden.

Nach der Zentrifugation bei 1.000 rpm für 5 min wurde der Überstand abpipettiert und alle *wells* mit 200 µl Waschpuffer versetzt. Nach erneuter Zentrifugation bei 1.000 rpm für 5 min und Entfernung des Überstands, wurden die Pellets in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und sofort am Durchflusszytometer analysiert.

### 3.13 Live-Cell Imaging

Live-cell Imaging ermöglicht es dynamische, phänotypische und morphologische Prozesse in einem zeitlichen Ablauf zu quantifizieren und visualisieren. In diesem Versuch sollte die durch TIML-, CIML- oder naiven NK Zellen (Kapitel 3.8) induzierte Apoptose in den Tumorzellen innerhalb der ersten 5 h an Tag 7 der Kultur gemessen werden.

An Tag 7 der Kultur wurden die Primingansätze der NK Zellen gezählt und  $0,3 \times 10^6$  Zellen entnommen. Diese wurden im Verhältnis 1:1 mit ungefärbten Nalm-16 Zellen in 150 µl RPMI + 10 % HuS aufgenommen und in eine 96-*well* F-Form Platte ausgesät. Als negative Kontrolle dienten Tumorzellen, die allein kultiviert wurden. Alle Ansätze wurden in Duplikaten gemessen.

Dem Medium wurde das Caspase 3/7 Reagenz (finale Konzentration 5 µM) für Live-Cell Imaging zugegeben. 4 Aufnahmen pro *well* erfolgten alle 20 Min mit einem 10x Objektiv in Rot, Grün und Phasenkontrast.

### 3.14 Cytotoxizitätstest

Im Cytotoxizitätstest wird die Fähigkeit der NK Zellen gemessen, bestimmte Zielzellen (z.B. Nalm-16) zu lysieren. Hierbei wurden die Priming-Ansätze sowie einen Tag zuvor CFSE-markierte Tumorzellen (3.17.1) verwendet.

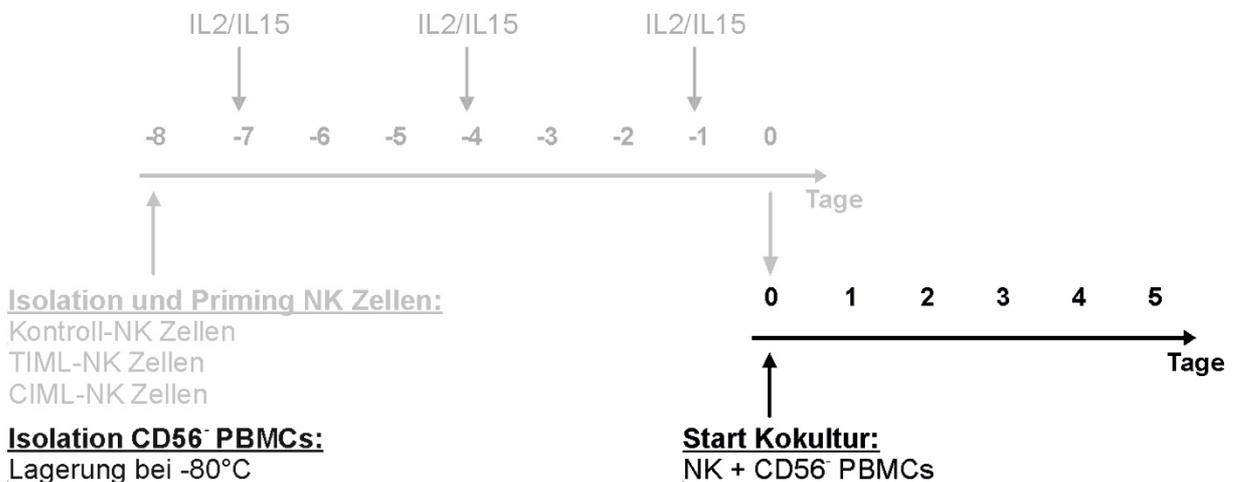
Primäre Leukämieproben wurden zuerst über einen Dichtegradienten aufgereinigt. Anschließend wurden alle Ansätze gezählt und mit RPMI + 10 % HuS auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die NK Zellen wurden mit den CFSE-markierten Zielzellen (Kapitel 3.17.1) für 5 h in den Verhältnissen 3:1 (150.000 NK Zellen zu 50.000 Tumorzellen) und 1:1 (100.000 NK zu 100.000 Zielzellen) in 96-*well* Platten in einem Gesamtvolumen von 200 µl im Brutschrank kokultiviert. Die Ansätze wurden in

technischen Triplikaten pipettiert. Zur Ermittlung des Spontantods der Zielzellen wurden diese in Monokultur-Ansätzen in gleicher Konzentration ausgesät für 5 h inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden alle Ansätze mit dem Farbstoff ARD- (*Amine reactive dye*) Pacific Blue lebend/tot gefärbt (Kapitel 3.17.3.1).

### 3.15 Kokultur von NK Zellen und PBMCs

Zur Untersuchung der immunregulatorischen Eigenschaften von Memory-like NK Zellen wurden diese nach Generierung (Kapitel 3.8) mit NK Zell-depletierten PBMCs (Kapitel 3.6) nach Schema aus Abbildung 4 kokultiviert.



**Abbildung 4 Übersicht Kulturmodell zur Kokultivierung von NK und PBMCs.** Dargestellt ist das experimentelle Layout sowohl zur Generierung von Memory-like NK Zellen (grau) und die Isolation und Kryokonservierung von CD56<sup>+</sup> PBMCs als auch die folgende Kokultur von NK Zellen und PBMCs für 5 Tage. Nach der Isolation von NK Zellen und deren Tumor- oder Cytokinpriming an Tag -8, wurden diese für 8 Tage kultiviert und an Tag -7, -4 und -1 mit IL2 und IL15 versorgt, um das Überleben der NK Zellen sicherzustellen. An Tag -1 wurden die CD56<sup>+</sup> PBMCs wieder aufgetaut und in Kultur genommen. Die Kokultur aus PBMCs und NK Zellen wurde an Tag 0 angesetzt und für 5 Tage bei 37 °C kultiviert.

NK Zell-depletierte PBMCs wurden einen Tag vor Start der Kokultur (Tag -1) aufgetaut (Kapitel 3.4), gezählt und auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt und mit IL2 (100 U/ml) in im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. An Tag 0 wurde die Zellzahl aller NK Zellansätze bestimmt und auf  $1 \times 10^6$  Zellen/ml mit RPMI + 10 % HuS eingestellt. Der Anteil der T Zellen in den PBMCs wurde durchflusszytometrisch bestimmt (Kapitel 3.17.2.2) und die berechnete Menge an PBMCs so zu den entsprechenden NK Zellansätzen gegeben, dass sich ein gleiches Verhältnis von T Zellen in den PBMCs zu NK Zellen ergab. Für die Stimulation einiger Ansätze wurden Nalm-16 Tumorzellen mit 100 Gy bestrahlt und im Verhältnis 1:3 (NK Zellen:Tumorzellen) zu den Ansätzen

gegeben. Alle Ansätze wurden zur Stimulation der T Zellen mit 1 µg/ml CD3 versetzt. Für das Überleben der NK Zellen wurden die Ansätze mit 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15 versorgt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bis zur Analyse.

### 3.16 Proliferation

Um den Anteil der Zellproliferation innerhalb der Kokultur-Ansätze zu bestimmen und zu vergleichen, wurden an Tag 0 die PBMCs mit 1 µM des Fluoreszenzfarbstoffs CFSE markiert (Kapitel 3.17.1). Da dieser Farbstoff das Zytoplasma der Zelle gleichmäßig anfärbt, kann über die Abnahme der Intensität des Farbstoffs durchflusszytometrisch bei jeder Teilung die Proliferation der Zellen verfolgt werden. Nach erfolgreicher CFSE-Markierung der PBMCs wurde die Kokultur mit NK Zellen angesetzt (Kapitel 3.15). Die Proliferation der PBMCs wurde an Tag 2 und Tag 3 der Kokultur nach entsprechender Färbung (Kapitel 3.17.2.6 und 3.17.4) im Durchflusszytometer ermittelt.

### 3.17 Durchflusszytometrische Färbungen

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen, Peptiden und DNA. Grundlage hierfür ist die Färbung einer Einzelzellsuspension mit Fluoreszenzfarbstoffen. Für die Färbung können sowohl Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper, DNA-interkalierende Farbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt werden.

Zur Analyse passieren die gefärbten Zellen im Durchflusszytometer einen fokussierten Laserstrahl, der die Fluoreszenzfarbstoffe anregt. Das so emittierte Licht wird von einem Detektor gemessen und verhält sich proportional zur gebundenen Antikörpermenge bzw. Zelle. Zusätzlich zur Fluoreszenz wird im Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC), welches parallel zum Probenfluss verläuft, die Größe der Zelle ermittelt und nimmt mit der Größe der Zelle zu. Im Seitwärtsstreulicht (*side scatter*, SSC), welches im 90° Winkel auf die Zellen trifft, wird die Granularität bestimmt. Auch hier wird das Licht von mehr Granula in der Zelle stärker abgelenkt.

Alle Färbungen wurden jeweils mit 0,1 - 1 x 10<sup>6</sup> Zellen entweder in Polystyren-Röhrchen oder in einer 96-well Platte durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten anschließend am BD LSRII bzw. BD Canto mit der BD FACSDIVA Software. Die Daten wurden schließlich mit der Software BD FACSDIVA und auch FlowJo ausgewertet.

### **3.17.1 CFSE-Markierung**

Für das Markieren mit Fluoreszenzfarbstoff bestimmter Zellen wurden diese in PBS aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die CFSE Lösung wurde anschließend so mit der Zellsuspension versetzt, dass eine Zielkonzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  CFSE für Cytotoxizitätstests und 1  $\mu\text{M}$  CFSE für Proliferationsmessungen eingestellt wurde. Der Farbstoff CFSE diffundiert passiv in die Zelle, wo er durch zelleigene Esterasen gespalten und somit die komplette Zelle fluoreszent markiert wird.

Die Suspension wurde im Brutschrank für 15 min inkubiert, danach mit 3 ml kaltem FCS abgestoppt und für 2 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 8 ml RPMI + 10 % FCS bei 350 g für 10 min wurden die Zellen ihrem entsprechenden Medium aufgenommen, eingestellt und im Brutschrank kultiviert.

Es wurden 20  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension entnommen und diese durchflusszytometrisch analysiert, um den Erfolg der CFSE-Markierung zu überprüfen.

### **3.17.2 Oberflächenfärbungen mit Primärantikörpern**

Für Oberflächenfärbungen wurden die entsprechenden Ansätze gezählt und  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die Färbungen wurden entweder in einer 96-well Platte oder einem FACS-Tube durchgeführt.

#### **3.17.2.1 CD56 und CD3 Frequenz**

Zur Bestimmung des Anteils an NK und T Zellen in einer Zellsuspension wurde der Antikörper CD56-BV421 (1:50) und CD3-PerCP (1:100) verwendet. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Färbung mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (400 g für 5 min). Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen im Rückfluss anschließend direkt durchflusszytometrisch analysiert.

#### **3.17.2.2 CD4 und CD8 Frequenz**

Zur Bestimmung des Anteils an T Zellen in NK Zelldepletierten PBMCs (Kapitel 3.6) wurden der Zellsuspension die fluoreszenzmarkierten Antikörper CD3-PE CF594 (1:50), CD4-FITC (1:10) und CD8-APC-H7 (1:50) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT wurde die Färbung mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (400 g für 5 min). Der Überstand wurde abgeschüttet und die Zellen im Rückfluss direkt durchflusszytometrisch untersucht.

### 3.17.2.3 NKG2D Kontrollfärbung

Diese Färbung diente als Kontrolle, ob der Oberflächenrezeptor NKG2D auf NK Zellen vollständig blockiert bzw. wieder frei war.

Für die Färbung wurde sowohl aus den blockierten als auch den unblockierten Ansätzen 30 µl Zellsuspension entnommen und in eine 96-well Platte überführt. Nach einer Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurden die Zellen in 50 µl FACS Puffer aufgenommen und mit CD56-BV421 (1:50), CD3-PerCP (1:100) und NKG2D-APC (1:25) für 20 min bei 4 °C gefärbt. Nach einem Waschschrift mit 200 µl FACS Puffer bei 400 g für 5 min erfolgte eine Lebend-Tot Färbung mit ARD-Pacific Blue (Kapitel 3.17.3.1). Danach wurden die Zellen entweder direkt analysiert oder in 0,5 % Formaldehyd (FA) fixiert. Zusätzlich wurde eine FMO (*fluorescence minus one*) Kontrolle mitgeführt, die nur mit CD56-BV421 (1:50) und CD3-PerCP (1:100) und dem Lebend-Tot Farbstoff ARD-Pacific Blue gefärbt wurde. Eine FMO Kontrolle enthält immer einen Fluoreszenz-markierten Antikörper weniger als die komplett gefärbte Probe, in diesem Fall NKG2D-APC. So können in der Durchflusszytometrie NKG2D<sup>+</sup> Zellen von NKG2D<sup>-</sup> Zellen klar abgegrenzt werden.

### 3.17.2.4 CD19 Kontrollfärbung

In Transwell-Experimenten soll der Kontakt von NK Zellen zu den Tumorzellen verhindert werden. Hierfür wurde an Tag 0 der Kultur aus allen Primingansätzen (Kapitel 3.11) jeweils 100 µl aus der Zellsuspension und dem Transwell-Insert für die Kontrollfärbung entnommen. Um eventuelle Tumorzellen in der Zellsuspension zu identifizieren wurde den Farbe-Ansätzen der fluoreszenzmarkierte CD19-APC (1:50) hinzugefügt. Im Anschluss an eine Inkubation von 20 min bei 4 °C folgte eine Lebend-Tot-Färbung mit ARD-Pacific Blue (Kapitel 3.17.3.1). Die Analyse erfolgte sofort am Durchflusszytometer oder die Proben wurden mit 0,5 % FA fixiert.

### 3.17.2.5 Oberflächenfärbung von NK Zellen

Neben der funktionellen Charakterisierung sollten naive, TIML- und CIML-NK Zellen auch phänotypisch untersucht werden. Hierfür wurden an Tag 7 der Kultur aus den jeweiligen Ansätzen  $0,5 \times 10^6$  Zellen entnommen und in eine 96-well Platte überführt. Nach Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurden die Zellen mit 50 µl FACS Puffer versetzt und mit den Antikörpern CD56-BUV395 (1:12,5), CD3-PE CF594 (1:50), CD16-AF700 (1:50), CXCR6-BV421 (1:20), CD57-PE (1:20), CD25-FITC (1:10), NKG2C-PerCP (1:10), NKG2D-PE-Vio770 (1:25), KLRG1-AF647 (1:100), NKp30-BV510 (1:12,5) und NKp46-BV605 (1:12,5) für 20 min im Dunkeln inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 200 µl FACS-Puffer wurden die Zellen mit dem Farbstoff ARD-AF350 lebend7tot gefärbt (3.17.3.3). Bei allen Färbungen wurden die entsprechenden Isotyp-Kontrollen mitgeführt.

### 3.17.2.6 Oberflächenfärbung von T Zellen

Um die Anteile an CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Kokultur von NK Zellen und PBMCs zu bestimmen, wurden jeweils 100 µl Zellsuspension aus den jeweiligen Ansätzen entnommen und in eine 96-well Platte überführt. Nach Zentrifugation bei 400 g für 5 min wurden die Zellen in 50 µl FACS Puffer aufgenommen und mit den Antikörpern CD56-BV711 (1:25), CD4-PerCP (1:100) und CD8-APC-H7 (1:50) für 20 min bei 4 °C im Dunkeln versetzt.

Damit die Memorysubsets der CD8<sup>+</sup> T Zellen im Durchflusszytometer identifiziert werden können, wurde in diesem Schritt bei einigen Proben zusätzlich noch CD45RO-PE-Cy7 (1:20), CD28-PE/Dazzle594 (1:20), CD25-BV605 (1:28,6) und CCR7-AF700 (1:20) 20 min bei 4 °C im Dunkeln mitgefärbt (Mahnke *et al.*, 2013).

Bei allen Proben folgte nach einem Waschschrift mit 200 µl FACS Puffer bei 400 g für 5 min eine lebend-Tot Färbung mit ARD-AF350 (Kapitel 3.17.3.3).

### 3.17.2.7 Oberflächencharakterisierung von Tumorzellen

Die Blasten P3B, P18R und P12K sowie die Tumorzelllinie Nalm-16 wurde auf wichtige Oberflächenmarker untersucht. Für jeden Antikörper wurde als Färbekontrolle in einem getrennten Ansatz ein Isotyp des gleichen Subtyps in gleicher Konzentration mitgeführt. Die Isotyp-Kontrolle soll eine unspezifische Bindung des Fc-Teils der Antikörper ausschließen und das Hintergrund-Signal identifizieren.

Für Färbung und Isotyp-Kontrollen wurden jeweils bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Für die Färbung der NKG2D-Liganden und des Rezeptors HLA-E wurden die Zellen zuerst in 100 µl Blockierpuffer für 30 min aufgenommen. Nach der Inkubation bei RT erfolgte die Primärfärbung mit MIC-A (1:100) zusammen mit MIC-B (1:100), ULBP1 (1:100), ULBP2 (1:100) und ULBP3 (1:100) bzw. HLA-E (1:25) ohne gekoppelten Farbstoff in Blockierpuffer in einem Gesamtvolumen von jeweils 50 µl bei RT für 20 min.

Es folgten drei Waschschriffe mit 200 µl FACS-Puffer und einer Zentrifugation bei 400 g für 5 min. Zur Färbung mit dem Sekundärantikörper in PE (1:50) wurden die Zellen in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert.

In weiteren Einzelfärbungen wurden die Tumorzellen mit den Antikörpern CD155-PE (1:20), CD112-PE (1:50), HLA-ABC-PE (1:50) und CD54-FITC (1:5) in 200 µl FACS-Puffer für 20 min bei 4 °C gefärbt.

Um bei der durchflusszytometrischen Analyse die Tumorzellen zu identifizieren wurden alle Einzelfärbungen zusätzlich parallel mit CD10-PECF594 (1:50) und CD19-APC (1:50) gefärbt.

Nach einem Waschschrift mit 200 µl FACS-Puffer und einer Zentrifugation bei 400 g für 5 min, erfolgte eine Lebend-Tot-Färbung mit ARD-Pacific Blue (Kapitel 3.17.3.1). Die Proben wurden entweder sofort im Durchflusszytometer analysiert oder mit 0,5 % FA fixiert.

### **3.17.3 Lebend-Tot Färbungen**

Im Anschluss an eine Oberflächenfärbung kann eine Lebend-Tot Färbung durchgeführt werden, um so lebende und tote Zellen zu unterscheiden. Tote Zellen sind in der Lage monoklonale Antikörper zu binden und können so in der Durchflusszytometrie ein falsch positives Signal liefern. ARD-(*Amine reactive dyes*) Farbstoffe können über die löchrige Membran toter Zellen in diese eindringen. Dort werden die ARD-Farbstoffe durch zelleigene Amine gespalten und der Farbstoff wird stark fluoreszent. Die reaktiven ARD-Farbstoffe können allerdings nicht die Zellmembran lebender Zellen überwinden und nur mit Oberflächenproteinen reagieren, was nur eine schwache Fluoreszenz zur Folge hat (Life Technologies, 2009).

Die Färbungen wurden entweder in einer 96-well Platte oder einem FACS-Tube durchgeführt.

#### **3.17.3.1 Lebend-tot Färbung mit ARD-Pacific Blue**

Um tote Zellen mit dem Farbstoff ARD-Pacific Blue in der Durchflusszytometrie zu unterscheiden, wurde die Zellsuspension zuerst mit 200 µl PBS gewaschen (400 g für 5 min). Nach Abschütten des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl PBS + 1 µl ARD-Pacific Blue (1:100 in DMSO vorverdünnt) aufgenommen und bei RT für 10 min im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze bei 400 g für 5 min abzentrifugiert und abschließend mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen (400 g für 5 min). Die Ansätze wurden entweder direkt analysiert oder mit 0,5 % FA fixiert.

#### **3.17.3.2 Lebend-tot Färbung mit ARD-Zombie Aqua**

Ein weiterer Farbstoff zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen in der Durchflusszytometrie ist ARD-Zombie Aqua. Hierfür wurden die zu färbenden Ansätze zuerst mit 200 µl PBS gewaschen (400 g für 5 min). Nach Abschütten des Überstandes wurden die Zellen in 100 µl PBS + 0,5 µl ARD-Zombie Aqua aufgenommen und für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze bei 400 g für

5 min abzentrifugiert und abschließend mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen (400 g für 5 min). Die Ansätze wurden entweder direkt analysiert oder mit 0,5 % FA fixiert.

### **3.17.3.3 Lebend-tot Färbung mit ARD-AF350**

Mit dem Farbstoff ARD-AF350 ist ebenfalls eine durchflusszytometrische Unterscheidung von lebenden und toten Zellen möglich. Für die lebend-tot Färbung mit diesem Farbstoff wurde die Zellsuspension zuerst mit 200 µl PBS gewaschen (400 g für 5 min). Nach Abschütten des Überstands wurden die Zellen in 200 µl PBS + 1 µl ARD-AF350 für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Ansätze bei 400 g für 5 min abzentrifugiert und abschließend mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen. Die Ansätze wurden entweder direkt analysiert oder mit 0,5 % FA fixiert.

### **3.17.4 Färbung von regulatorischen T Zellen**

Neben Oberflächenrezeptoren ist es in der Durchflusszytometrie auch noch möglich, intrazelluläre Moleküle wie DNA oder auch Transkriptionsfaktoren anzufärben. Bei intrazellulären Färbungen wird generell zwischen intrazytoplasmatischen Färbungen für beispielsweise Cytokine und intranukleäre Färbungen für DNA oder Transkriptionsfaktoren unterschieden.

Zur Bestimmung von Tregs wurde zusätzlich zu CD4 (Kapitel 3.17.2.6) noch CD25-BV605 (1:28,6) für 20 min bei 4 °C auf der Oberfläche mitgefärbt. Des Weiteren wurde auch noch der Transkriptionsfaktor FoxP3 intranukleär angefärbt, um so eindeutig auf regulatorische T Zellen zu gaten. Hierfür wurden die Zellen nach der lebend-tot Färbung mit ARD-AF350 (Kapitel 3.17.3.3) und der Oberflächenfärbung mit primären Antikörpern (Kapitel 3.17.2.2) in 200 µl FoxP3 Fix/Perm *working solution* aufgenommen und für 40 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Ansätze zweimal mit jeweils 200 µl *Permeabilization* Puffer bei 400 g für 5 min gewaschen, um dann in 25 µl *Permeabilization* Puffer mit FoxP3-AF647 (1:12,5) aufgenommen zu werden. Nach einer Inkubation von 40 min bei RT im Dunkeln wurde 150 µl *Permeabilization* Puffer zugegeben und die Zellen bei 400 g für 5 min abzentrifugiert. Nach abschließendem Waschen mit 200 µl FACS Puffer bei 400 g für 5 min wurden die Zellen entweder direkt analysiert oder mit 0,5 % FA fixiert.

### 3.18 Mykoplasmentest

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mit Hilfe des *Venor® GeM OneStep Kits* negativ für Mykoplasmen getestet. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und beruht auf der Amplifizierung der 16S rRNA im Mykoplasmen genom.

100 µl der zu testenden Zellkultur wurden entnommen und für 5 min auf 95 °C erhitzt. Danach wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit für 15 sec abzentrifugiert, um eventuellen Zellschrott zu pelletieren. 2 µl des Überstandes wurden direkt für die PCR eingesetzt. 23 µl des *OneStep Mixes* wurde in PCR-Tubes vorgelegt und 2 µl der Probe hinzugegeben. Zusätzlich wurden noch weitere Ansätze mit *OneStep Mix* und 2 µl Positiv Kontrolle bzw. 2 µl frisches Zellkulturmedium (negative Kontrolle) mitgeführt.

Nach Durchlaufen des PCR Programms wurden die Proben mit Laufpuffer (1:6) versetzt und 5 µl des Gemischs zusammen mit einem 100 bp-Marker auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen. Nach etwa 20 min bei 100 V konnte das Agarosegel im Imaging System Odyssey Fc ausgewertet werden. Die interne Kontrolle lag bei 191 bp, während sich eine Kontamination mit Mykoplasmen mit einer Band bei 265 - 278 bp zeigen würde.

### 3.19 Statistik

Die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde in Experimenten mit mehr als zwei Messwerten aber nicht mehr als 2 Gruppen durchgeführt und erfolgte mit dem zweiseitigen ungepaarten studentischen t-Test:

*	p < 0,05	signifikant
**	p < 0,01	hoch signifikant
***	p < 0,001	höchst signifikant

### 3.19.1 Spezifische Lyse

Nach der durchflusszytometrischen Analyse der fluoreszenzgefärbten Zellen aus dem Cytotoxizitätstest (Kapitel 3.14) wird der Mittelwert der lysierten Targetzellen, also der CFSE und Pacific Blue doppelt positiven Zellen, des jeweiligen Ansatzes gebildet. In die Berechnung der spezifischen Lyse fließt dann noch der Spontantod der Targetzellen mit ein, welcher sich aus den CFSE und Pacific Blue doppelt positiven Monokultur-Ansätzen ermittelt. Die spezifische Lyse berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{(\% \text{ lysierte Targetzellen}) - (\text{Spontantod Targetzellen})}{100 \% - (\text{Spontantod Targetzellen})}$$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 *In vitro* Cytotoxizitätstests von TIML-NK Zellen

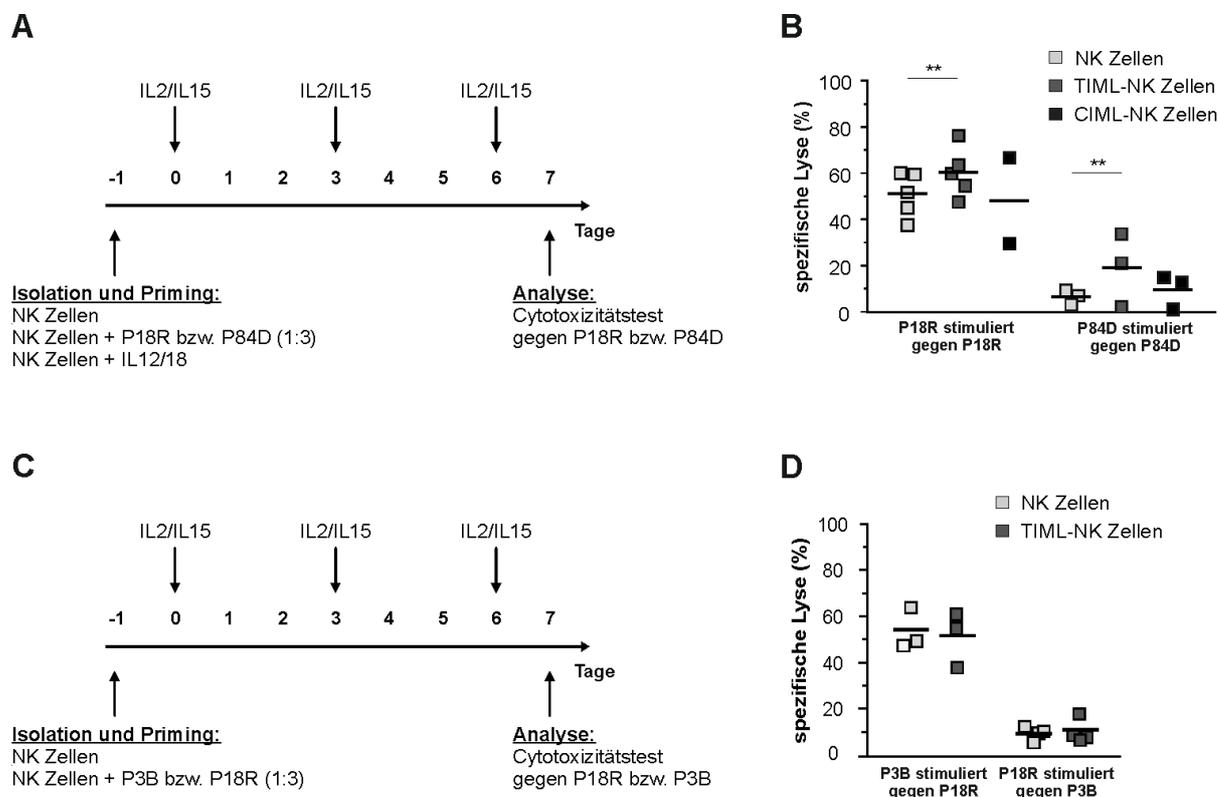
Bis heute sind mehrere Formen von Memory-like NK Zellen beschrieben und werden mit Langlebigkeit, Antigen-restringierten Immunantworten und letztlich unter gewissen Bedingungen auch einer gesteigerten Funktionalität in Verbindung gebracht. In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem die Charakterisierung von humanen NK Zellen nach Stimulation mit bestrahlten Tumorzellen, einem sogenannten Priming, auf eine veränderte Anti-Tumorantwort vorgenommen werden. Denn das Potential einer gesteigerten Funktionalität konnte die Arbeitsgruppe André nach vorausgehendem Kontakt mit verschiedenen kindlichen Leukämien erstmals zeigen (Pal *et al.*, 2017).

Für die Analyse der Funktionalität dieser Tumor-induzierten Memory-like NK Zellen (TIML-NK Zellen) wurden humane NK Zellen nach magnetischer Isolation aus PBMCs gesunder Spender mit bestrahlten Tumorzellen im Verhältnis 1:3 (NK Zellen:Tumorzellen) versetzt. Nach acht Tagen Kokultur unter Zugabe von niedrig dosiertem IL2 und IL15 wurden die TIML-NK Zellen erneut mit Tumorzellen in einem Cytotoxizitätstest in Kontakt gebracht. Als Kontrolle wurden unstimulierte, sowie IL12 und IL18 stimulierte NK Zellen (Cytokin induzierte Memory-like NK Zellen, CIML-NK Zellen) verwendet, welche ebenfalls acht Tage unter den gleichen Bedingungen kultiviert wurden (Abbildung 5 A, C).

TIML-NK Zellen, welche an Tag -1 der Kultur mit der Tumorzelllinie Nalm-16 stimuliert wurden, zeigen an Tag 7 in einem *in vitro* Cytotoxizitätstest eine signifikant höhere Lyse der gleichen Tumorzelllinie verglichen mit unstimulierten NK Zellen (Abbildung 5 B). Somit führt ein vorausgehender Tumorkontakt zu einer Konvertierung der NK Zellen in TIML-NK Zellen, welche eine gesteigerte Funktionalität aufweisen. Als Kontrolle wurden in diesen Experimenten CIML-NK Zellen (Romee *et al.*, 2012) mitgeführt, welche an Tag -1 der Kultur mit IL12 und IL18 stimuliert wurden. Auch ein Priming mit primären, kindlichen BCP-ALL Blasten P3B an Tag -1 führt zur Induktion von TIML-NK Zellen und somit zu einer signifikant gesteigerten Anti-Tumorantwort gegenüber den Blasten P3B (Abbildung 5 C). Sowohl die Lyse der unstimulierten, als auch der TIML-NK Zellen der kindlichen Blasten P3B liegt generell niedriger als die Lyse der Tumorzelllinie Nalm-16.



die Lyse der Blasten generell sehr viel niedriger als in vergleichbaren Ansätzen mit P18R, aber auch hier zeigt sich eine signifikant gesteigerte cytotoxische Aktivität von TIML-NK Zellen gegenüber P84D verglichen mit unstimulierten NK Zellen (Abbildung 6 B).



**Abbildung 6 Tumorpriming von NK Zellen führt zu tumorspezifischen TIML-NK Zellen.** (A) Experimentelles Layout zur Konvertierung von NK Zellen in TIML-NK Zellen mit bestrahlten kindlichen, primären Blasten der anonymisierten Patienten P18R und P84D. Als Kontrolle wurden CIML-NK Zellen verwendet. (A, B) An Tag 7 der Kultur erfolgte der Cytotoxizitätstest gegen P18R bzw. P84D. (B) P18R stimulierte TIML-NK Zellen (dunkelgrau) zeigen hoch signifikant gesteigerte Lyse der P18R Blasten verglichen mit unstimulierten (hellgrau) und CIML-NK Zellen (schwarz). Auch P84D stimulierte TIML-NK Zellen (dunkelgrau) zeigen eine hoch signifikant verbesserte Tumor-Antwort gegenüber P84D Blasten als unstimulierte (hellgrau) oder CIML-NK Zellen (schwarz). Die Daten repräsentieren 5 bzw. 3 Spender (Cytotoxizitätstest gegen P18R) und 3 Spender (Cytotoxizitätstest gegen P84D). (C) Schematische Darstellung zum Priming mit P3B und Funktionalitätstest gegen P18R bzw. Priming mit P18R und Cytotoxizitätstest gegen P3B. (D) An Tag 7 der Kultur wurden, wie angegeben andere Tumorzellen verwendet, wie zuvor im Priming. Hier zeigen die TIML-NK Zellen (dunkelgrau) eine ähnlich niedrige cytotoxische Aktivität gegen die Tumorzellen, wie unstimulierte NK Zellen (hellgrau). Die Daten repräsentieren 3 (P3B Priming) bzw. 4 Spender (P18R Priming). Alle Messungen im Cytotoxizitätstest wurden in Triplikaten im Verhältnis 3:1 (E:T) durchgeführt und als Mittelwert dargestellt. Der Mittelwert aller Spender ist als Strich dargestellt. \*\* p < 0,01.

Um zu untersuchen, ob diese Steigerung der Cytotoxizität an Tag 7 der TIML-NK Zellen auf die im Priming verwendete Tumorentität beschränkt ist oder sich auch auf andere Tumorzellen übertragen lässt, wurden frisch isolierte NK Zellen an Tag -1 mit

Tumorzellen geprimt, an Tag 7 im Cytotoxizitätstest aber einer anderen Tumorentität ausgesetzt (Abbildung 6 C). Die Untersuchungen zeigen, dass die Zunahme der cytotoxischen Aktivität von TIML-NK Zellen tumorspezifisch ist, da keine Erhöhung der spezifischen Lyse detektiert werden konnte, wenn sich die Tumorzellen vom Priming und vom Cytotoxizitätstest unterscheiden. Diese Aussage kann sowohl für ein Priming mit der ALL Probe P3B und einem Cytotoxizitätstest mit der AML Probe P18R als auch umgekehrt bestätigt werden (Abbildung 6 D).

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ein vorausgehender Tumorkontakt von NK Zellen mit ALL oder AML Proben TIML-NK Zellen induziert, welche eine erhöhte, tumorspezifische Funktionalität aufweisen.

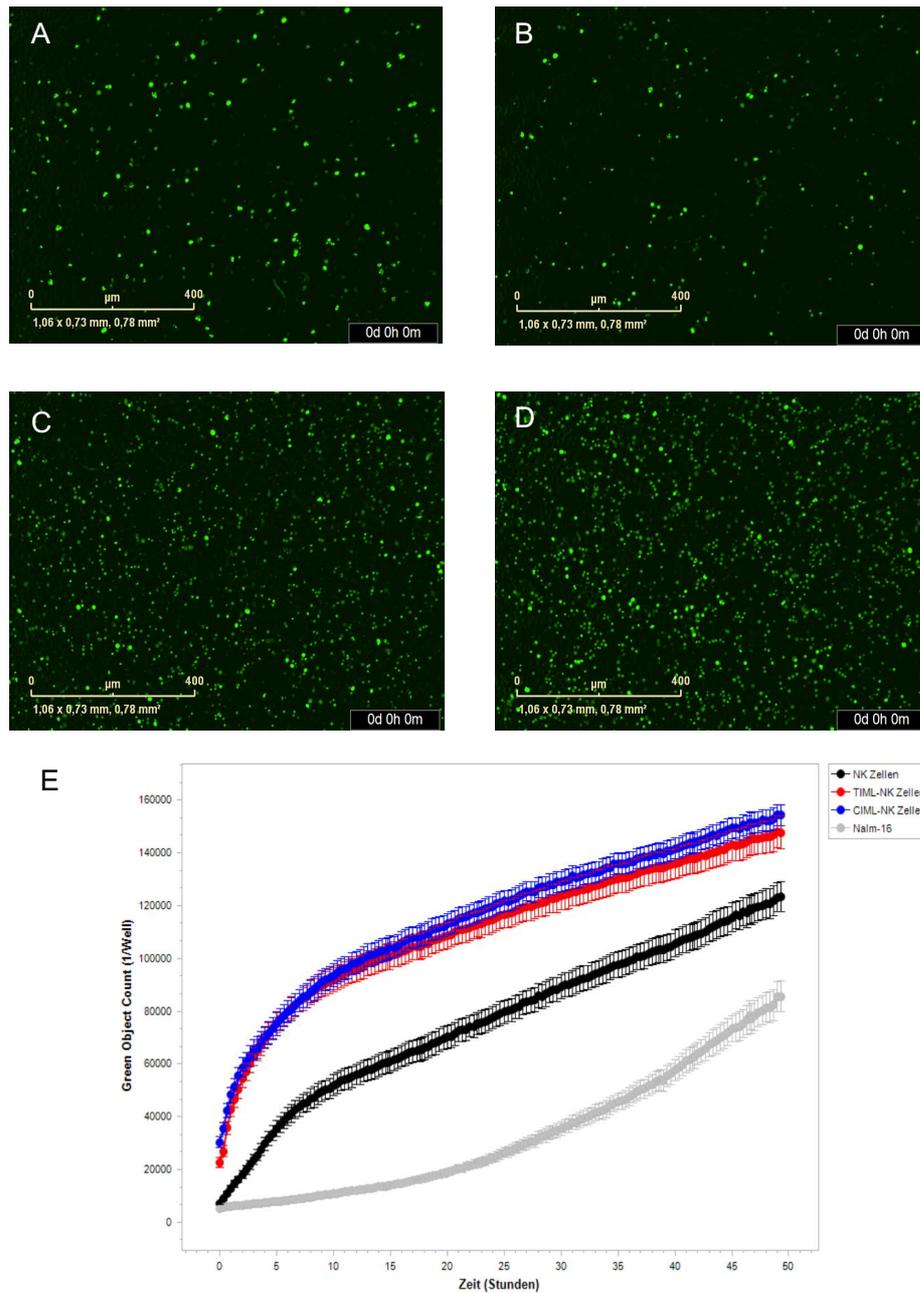
## 4.2 Apoptose-Induktion von TIML-NK Zellen

Neben der Beschreibung der Funktionalität der TIML-NK Zellen im Vergleich zu naiven NK Zellen, sollte auch die Fähigkeit zur Induktion von Apoptose bei Tumorzellen untersucht werden. Deshalb wurden alle NK Zellansätze an Tag 7 der Kultur mit Nalm-16 Tumorzellen im Verhältnis 1:1 (Tumorzelle:NK Zelle) versetzt und mit Hilfe eines *Live Cell Imaging* Geräts die Apoptose-Rate über die Zeit mittels grünem Fluoreszenzsignals durch Caspase 3/7 alle 20 Minuten bestimmt (Abbildung 7).

Wird die Apoptose in Abhängigkeit der Zeit quantifiziert (Abbildung 7 E), kann gezeigt werden, dass sowohl TIML- als auch CIML-NK Zellen viel schneller und stärker Apoptose bei Nalm-16 Zellen induzieren können, als ungeprimte, naive NK Zellen desselben Spenders. Die Negativkontrolle, bestehend aus Tumorzellen ohne NK Zellen, zeigt eine nur sehr geringe Apoptose-Rate, welche allerdings ab 30 h leicht ansteigt.

Der starke Anstieg des Apoptose-Signals in den NK Zellansätzen nimmt nach 7 h leicht ab, wird aber weiterhin bis zum Ende der Messung in allen Ansätzen kontinuierlich stärker.

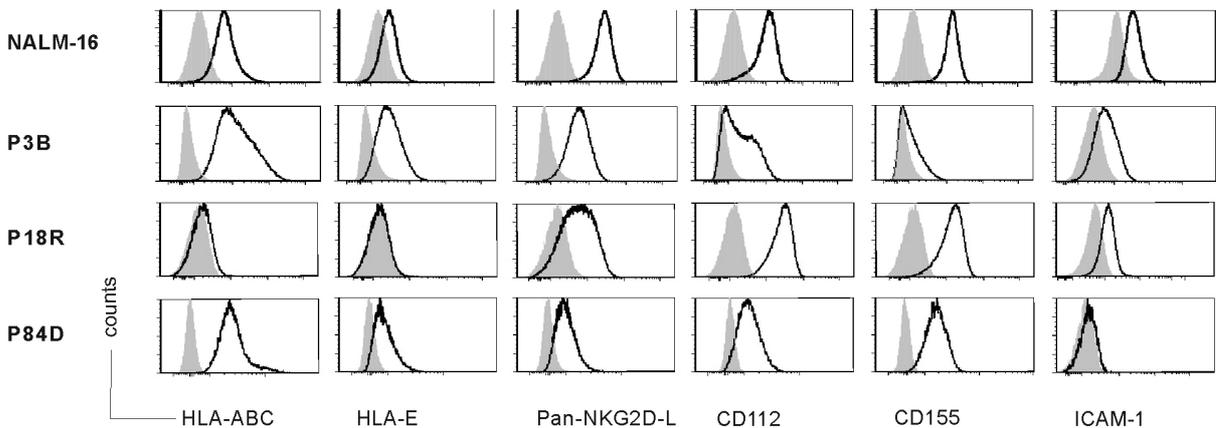
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass TIML- und CIML-NK Zellen in der Lage sind, schneller und verstärkt Apoptose bei Tumorzellen zu induzieren. Somit belegen auch diese Daten, dass ein vorausgehender Tumorkontakt oder eine Stimulation mit den Cytokinen IL12 und IL18 eine erhöhte Funktionalität gegenüber Tumorzellen zur Folge hat.



**Abbildung 7 TIML- und CIML-NK Zellen induzieren schneller Apoptose im Kontakt mit Tumorzellen als naive NK Zellen.** Live Cell Imaging mit Messung der Apoptose-Induktion. NK Zellansätze wurden an Tag 7 mit ungefärbten Nalm-16 Tumorzellen versetzt und das Caspase-3/7 Fluoreszenz-Signal wurde in vier Einzelbildern alle 20 min für 50 h gemessen. Dargestellt ist ein Spender, welcher in Duplikaten angesetzt wurde. Gezeigt sind Einzelbilder zu Beginn des Live Cell Imaging der (A) Monokultur Nalm-16, sowie (B) NK Zellen, (C) TIML-NK Zellen und (D) CIML-NK Zellen jeweils in Kokultur mit Tumorzellen. (E) Grafische Darstellung des Apoptose-Signals über die Zeit. Die Punkte zeigen den Mittelwert des Fluoreszenz-Signals, die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar. Das gezeigte Experiment repräsentiert einen Spender.

### 4.3 Charakterisierung der verwendeten Tumorzellen

Die BCP-ALL Tumorzellen Nalm-16, P3B sowie die AML Proben P18R und P84D dienten in Experimenten zur Charakterisierung der Funktionalität von TIML-NK Zellen häufig als Zielzellen. Aufgrund dessen wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht, um eventuelle Rückschlüsse auf die Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen ziehen zu können (Abbildung 8).



**Abbildung 8 Oberflächencharakterisierung von verwendeten Tumorzellen hinsichtlich ihrer NK-Zellliganden.** Dargestellt ist die durchflusszytometrische Charakterisierung und Expression ausgewählter Oberflächenrezeptoren der BCP-ALL Tumorzelllinie Nalm-16 und der kindlichen Blasten P3B sowie der kindlichen AML Blasten P18R und P84D. Die Analyse der NKG2D-Liganden (Pan-NKG2D-L) umfasst die Färbung von MIC-A, MIC-B und ULBP1-3. Gezeigt ist eine repräsentative Probe der Zellen, gefärbt mit spezifischem Antikörpermix (offenes Histogramm, schwarze Linie) und den entsprechenden Isotypkontrollen (Histogramm grau gefüllt).

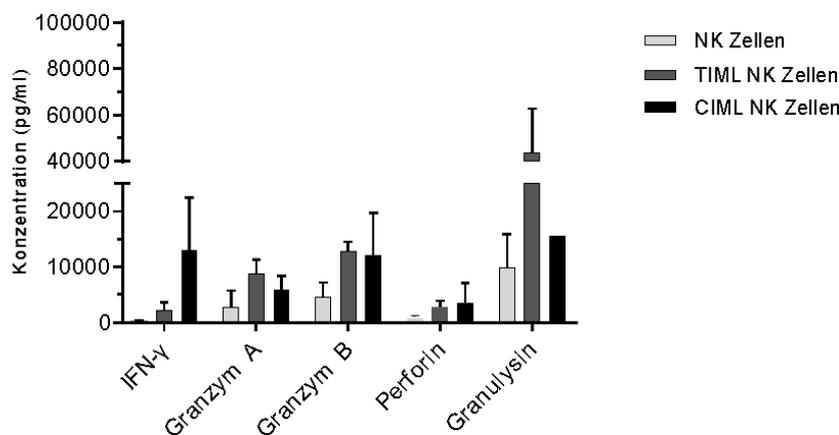
Die pädiatrische Tumorzelllinie Nalm-16 zeigt bei fast allen hier untersuchten Oberflächenrezeptoren die höchste Expression. Lediglich die anonymisierte BCP-ALL Patientenprobe P3B zeigt eine leicht höhere Expression beider Marker HLA-ABC und HLA-E. Ebenfalls fällt auf, dass bei der primären AML-Probe des anonymisierten Patienten P18R fast keine HLA-ABC und HLA-E Expression detektierbar ist. Auch das Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 wird von den kindlichen Blasten P84D (AML) kaum exprimiert. Alle charakterisierten Tumorzellen zeigen eine mittlere Expression des Nectin-2 Rezeptors (CD112) und des Poliovirus Rezeptors CD155. Eine Ausnahme hiervon stellt lediglich die Tumorprobe P3B dar. Des Weiteren sind bei allen getesteten Tumorzellen Liganden für den Rezeptor NKG2D (Pan-NKG2D-L) auf der Oberfläche detektierbar.

Somit stellen die in dieser Arbeit verwendeten Tumorproben geeignete Targetzellen in Cytotoxizitätstests für NK Zellen dar und auch die Untersuchungen zur Beteiligung der

NKG2D/IL15-Achse bei der Konvertierung in TIML-NK Zellen kann mit diesen Leukämien durchgeführt werden.

#### 4.4 Untersuchungen zum Zell-Kontakt bei der Konvertierung in TIML-NK Zellen

Nachdem die TIML-NK Zellen funktionell beschrieben wurden (Abbildung 5, Pal *et al.*, 2017), sollte geklärt werden, wie die Konvertierung von naiven NK Zellen in TIML-NK Zellen abläuft. Zuerst stellte sich die Frage, ob die Induktion von TIML-NK Zellen Zellkontakt benötigt oder ob Cytokine alleine für eine Konvertierung ausreichen. Zur Beschreibung der Zusammensetzung des Cytokin-Milieus während der achttägigen Kokultur der Primingansätze wurden die jeweiligen Überstände an Tag 0, 4, 6 und 7 analysiert. Im Folgenden wird nur auf die Zusammensetzung der Cytokine und cytotoxischen Marker an Tag 7 eingegangen, da die Untersuchungen an Tag 0, 4 und 6 nur sehr geringe Unterschiede in der Milieu-Zusammensetzung zeigten (Abbildung 9).



**Abbildung 9 Analyse des Milieus von Cytokinen und cytotoxischen Markern bei der Konvertierung in TIML- und CIML-NK Zellen an Tag 7 der Kultur.** Analytierte Cytokine und cytotoxische Marker und deren Konzentration während der Generierung von TIML- und CIML-NK Zellen im Vergleich zu unstimulierten NK Zellen an Tag 7 der Kultur. TIML-NK Zellen wurden an Tag -1 mit P3B geprimt, CIML-NK Zellen mit IL12 und IL18 vorbehandelt. Die Daten repräsentieren 3 Spender. 2 von 3 Datenpunkten konnten hinsichtlich des Analyts Granulysin bei CIML-NK Zellen nicht ausgewertet werden, weshalb hier nur ein Spender dargestellt ist. Alle Messungen wurden im Durchflusszytometer in Triplikaten gemessen. Der Balken stellt den Mittelwert aller Spender sowie die Standardabweichung dar.

Die Analyse an Tag 7 nach der Konvertierung in TIML- und CIML-NK Zellen zeigt, dass sich die untersuchten Analyte in ihrer Sekretion zwischen Memory-like und naiven NK Zellen unterscheiden. Vor allem IFN- $\gamma$  wird von CIML-NK Zellen an Tag 7 der Kultur exprimiert, während unstimulierte NK Zellen fast kein IFN- $\gamma$  ausschütten. Granulysin

hingegen liegt in höheren Konzentrationen in der Kultur an Tag 7 vor und wird vermehrt von TIML-NK Zellen sekretiert, während die Expression bei naiven und CIML-NK Zellen ähnlich hoch ist. Bei den Analyten Granzym A, B und Perforin zeigen sich zwischen den Ansätzen nur geringe Unterschiede.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das Milieu während der Kultur in den Primingansätzen variiert. Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die Konvertierung der TIML-NK Zellen anders abläuft, als die der CIML-NK Zellen.

Nach der Beschreibung der Zusammensetzung des Cytokin-Milieus, sollte in weiteren Experimenten die Rolle des Zellkontakts untersucht werden. Hierfür wurden die Tumorzellen in Transwell-Einsätzen ausgesät. So konnte sichergestellt werden, dass NK Zellen im *well* nicht mit den Tumorzellen in Kontakt treten, sekretierte Cytokine und Chemokine über die permeable Membran allerdings ausgetauscht werden können. TIML-NK Zellen, welche mit bestrahlten Nalm-16 Zellen direkt kultiviert wurden, dienten als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden in den unstimulierten sowie CIML-NK Zellen auch Transwell-Einsätze mitgeführt, um einen möglichen Effekt der Einsätze auf die NK Zellen auszuschließen (Abbildung 10 A).

Der Cytotoxizitätstest an Tag 7 zeigt wieder eine erhöhte Lyse der TIML-NK Zellen verglichen mit den unstimulierten NK Zellen (Abbildung 10 B). Auch für die CIML-NK Zellen kann eine gesteigerte Anti-Tumorantwort gegenüber den Tumorzellen Nalm-16 nachgewiesen werden. Können die isolierten, primären NK Zellen während der achttägigen Kultur nicht direkt mit den Tumorzellen in Kontakt treten, zeigt sich keine erhöhte Funktionalität gegenüber den Nalm-16 Tumorzellen.

Somit lässt sich sagen, dass sekretierte Cytokine und Chemokine allein für eine Induktion der Konvertierung in TIML-NK Zellen und eine damit verbundene erhöhte Funktionalität nicht ausreichen. Des Weiteren kann angenommen werden, dass ein direkter Tumorkontakt zwischen NK und Tumorzelle notwendig ist, um TIML-NK Zellen zu induzieren.





## 4.5 Die Rolle der NKG2D/IL15 Achse bei der Konvertierung in TIML-NK Zellen

Im Rahmen dieses Projektes sollte die NKG2D/IL15 Achse genauer untersucht werden, da der *natural killer group 2 member D* (NKG2D) Rezeptor ohne Kostimulation NK Zellen aktivieren kann. Des Weiteren kann IL15 die Expression von NKG2D auf humanen NK Zellen hochregulieren (Sutherland *et al.*, 2002) und auch die intrazelluläre Signalweiterleitung von NKG2D ist von dem IL15R abhängig (Hornig *et al.*, 2007). Auch werden Tumorzelllinien, welche NKG2D-Liganden exprimieren, mit gesteigerter Affinität lysiert, was die Bedeutung des NKG2D Rezeptors für die Cytotoxizität von NK Zellen unterstreicht (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001; Diefenbach *et al.*, 2000).

Eine Konvertierung in TIML-NK Zellen kann auch ohne kostimulatorische Signale erfolgen, was die vorherigen Ergebnisse mit Zellfragmenten mit der Zelllinie Nalm-16 belegen (Abbildung 11). Um die Fragestellung zu untersuchen, ob NKG2D an der Konvertierung in TIML-NK Zellen beteiligt ist, wurde ein Modell entwickelt, in dem dieser Rezeptor auf NK Zellen vor dem Priming mittels Antikörperzugabe blockiert wird. Gleichzeitig sollte aber sichergestellt sein, dass der NKG2D Rezeptor an Tag 7 für den Cytotoxizitätstest wieder frei zugänglich für Liganden war, da sonst die Lyse der NK Zellen maßgeblich beeinträchtigt sein könnte.

Hierfür wurden an Tag -1 die frisch isolierten NK Zellen mit 20 µg NKG2D Antikörper blockiert und nach erfolgreicher Überprüfung der Blockade im Durchflusszytometer mit den bestrahlten primären, kindlichen Blasten P3B für das Priming versetzt. Als Kontrolle dienten naive, unblockierte NK Zellen und unblockierte NK Zellen, welche ebenfalls mit bestrahlten Blasten stimuliert wurden. Diese Tumorzellen wurden für die Blockade-Experimente ausgewählt, da sie ausreichend NKG2D-Liganden auf ihrer Oberfläche exprimieren und so geeignete Zielzellen darstellen (Abbildung 8).

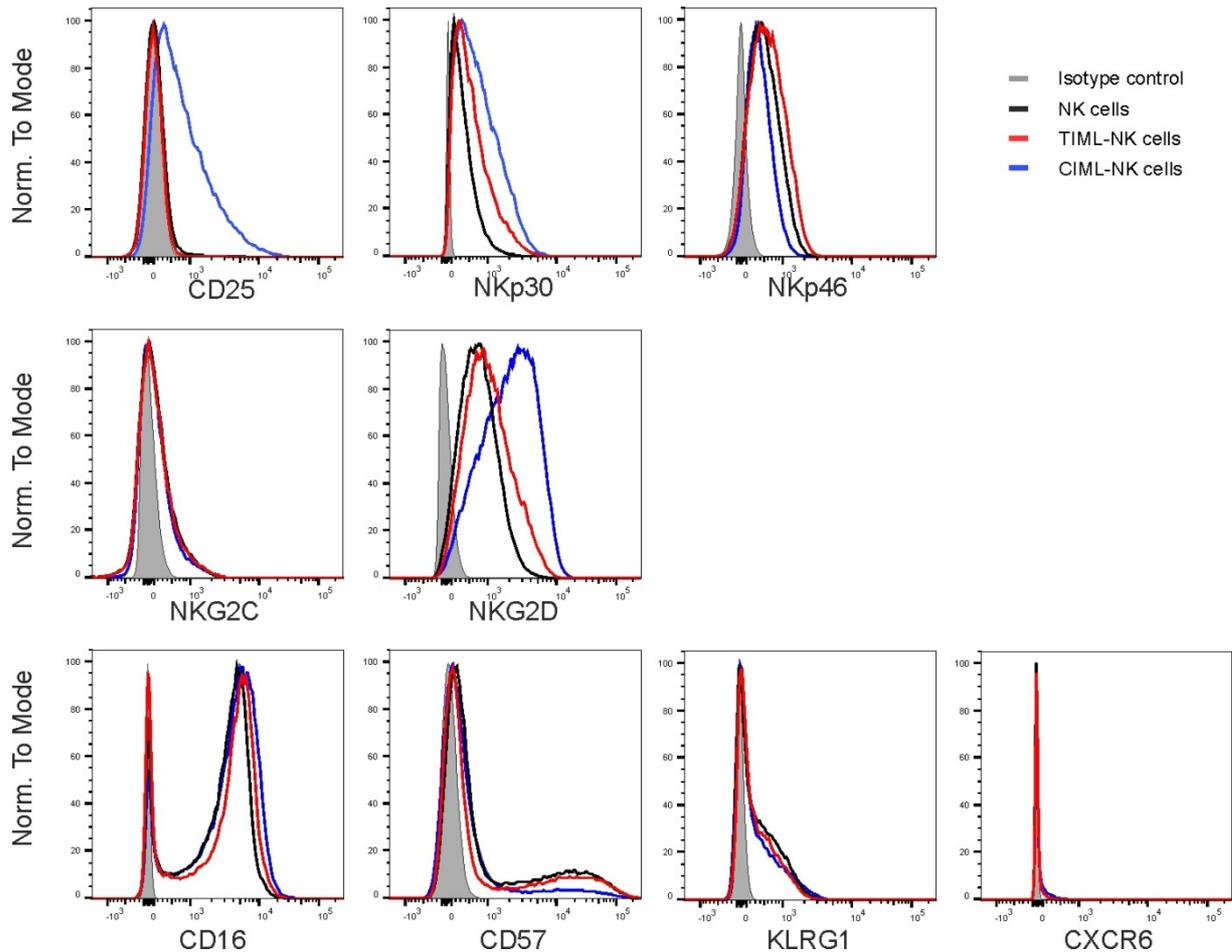
Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigen, dass der NKG2D Rezeptor durch die Zugabe von 20 µg NKG2D-Antikörper an Tag 3 der Kultur noch vollständig blockiert ist, an Tag 7 jedoch das Expressionsniveau von unblockierten NKG2D Rezeptoren zwischen den unblockierten und zuvor blockierten Ansätzen vergleichbar hoch ist (Daten nicht gezeigt).

Somit hat diese Blockade des NKG2D-Rezeptors keinerlei Auswirkungen auf die cytotoxische Aktivität der NK Zellen an Tag 7. Diese Annahme kann durch den Vergleich der spezifischen Lyse zwischen den unblockierten und blockierten NK Zellansätzen bestätigt werden, da diese ähnlich hoch liegt. In den Kontrollansätzen kann, wie bereits



## 4.6 Phänotypische Untersuchungen von TIML-NK Zellen

Bisher konnten die TIML-NK Zellen rein funktionell durch eine gesteigerte, tumorspezifische Lyse charakterisiert werden. Eine Analyse bestimmter Oberflächenmarker an Tag 7 der Kultur von TIML-NK Zellen verglichen mit naiven NK Zellen, sollte Aufschluss über den Phänotyp der TIML-NK Zellen geben.



**Abbildung 13 Phänotypische Untersuchung naiver und TIML-NK Zellen an Tag 7.** Durchflusszytometrische Untersuchung verschiedener Oberflächenrezeptoren auf naiven (offenes Histogramm, schwarze Linie), Nalm-16 stimulierten NK Zellen (TIML-NK Zellen, offenes Histogramm, rote Linie) und IL12 und IL18 vorbehandelte NK Zellen (CIML-NK Zellen, blaue Linie) von Tag 7. Gezeigt ist ein repräsentativer Spender. Entsprechende Isotypkontrollen wurden mitgeführt (grau gefülltes Histogramm) (Manuskript in Revision, Schwab *et al.*, 2018).

Generell sind die Unterschiede im Expressionsmuster der untersuchten Oberflächenmarker zwischen naiven, TIML- und CIML-NK Zellen sehr gering. Dennoch können bei einigen Rezeptoren marginale Expressionsunterschiede festgestellt werden. Verglichen mit naiven NK Zellen exprimieren TIML-NK Zellen, wie in Abbildung 13 dargestellt, deutlich mehr NKp30 und NKp46. Vor allem aber in der Expression des IL2 Rezeptors unterscheiden sich TIML- von CIML-NK Zellen: CD25 ist bei CIML-NK Zellen

deutlich hochreguliert. Das Expressionsniveau von NKG2D ist, verglichen mit unstimulierten NK Zellen, auf CIML-NK Zellen deutlich und auf TIML-NK Zellen leicht erhöht. Die Population der NKG2C<sup>+</sup> Zellen ist sowohl bei TIML- als auch CIML-NK Zellen sehr klein.

Zusammenfassend lassen die vorliegenden Daten keine signifikante Regulation eines oder mehrerer spezifischer Marker von TIML-NK Zellen verglichen mit ungeprimten NK Zellen erkennen. Einzig die stärkere Expression des Oberflächenmarkers CD25 bei CIML-NK Zellen verglichen mit unstimulierten NK Zellen lässt sich durch diese Experimente bestätigen (Leong *et al.*, 2014; Romee *et al.*, 2012).

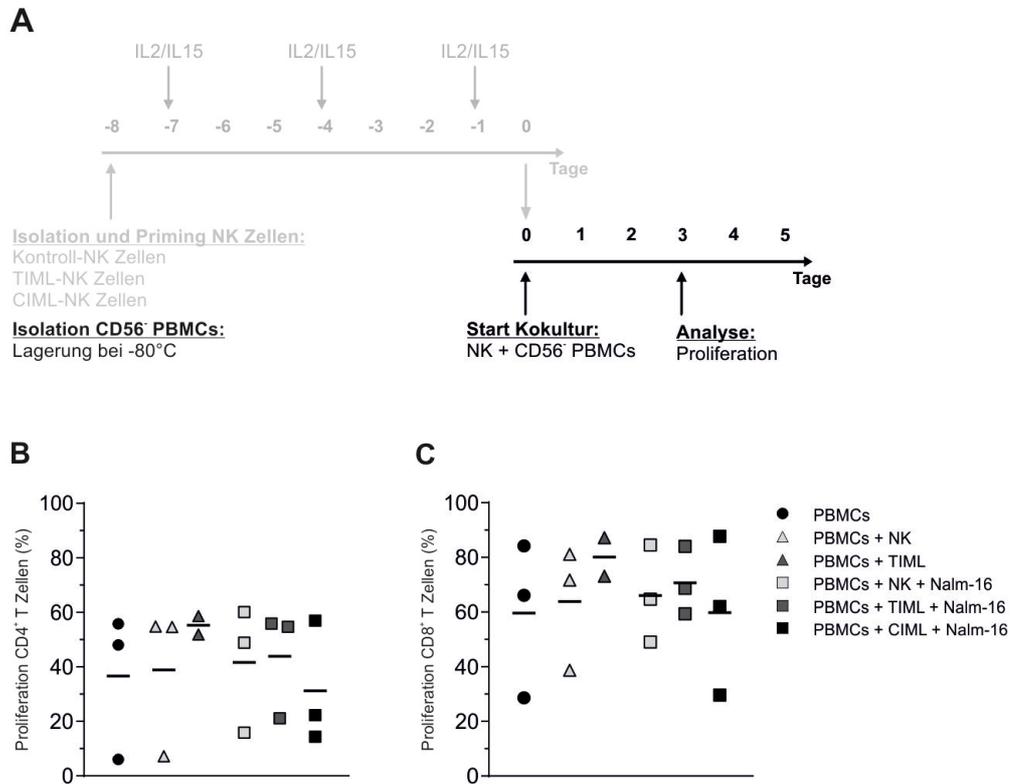
#### **4.7 Proliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen**

NK Zellen spielen nicht nur bei der Anti-Tumorantwort eine große Rolle, sondern sind auch in der Lage, adaptive Immunantworten zu beeinflussen. Deshalb sollte in weiteren Experimenten der Einfluss von naiven und Memory-like NK Zellen auf andere Zelltypen des Immunsystems, vor allem aber auf T Zellen, verglichen und beschrieben werden. In einem ersten Schritt wurde hierfür ein autologes Kokulturmodell aus naiven bzw. Memory-like NK Zellen und CD56-depletieren PBMCs etabliert (Abbildung 10 A). So kann ein direkter oder indirekter Einfluss der NK Zellen auf beispielsweise T Zellen betrachtet werden.

In dem hier etablierten Modell wurde der Kokultur zu Beginn 1 µg/ml löslicher CD3-Antikörper zur Stimulation der T Zellen hinzugegeben. Des Weiteren wurde IL2 und IL15 hinzugefügt, um das Überleben der NK Zellen während der Kokultur sicherzustellen.

Zunächst sollte die Proliferation der T Zellen nach Kokultur mit naiven bzw. Memory-like NK Zellen in An- oder Abwesenheit von bestrahlten Nalm-16 adressiert werden, da diese Analyse Informationen über den Aktivierungsstatus der T Zellen liefert. Wie in Abbildung 14 B gezeigt, nimmt die Proliferation sowohl der CD4<sup>+</sup> als auch der CD8<sup>+</sup> T Zellen nach drei Tagen Kokultur mit NK Zellen und TIML-NK Zellen sowohl in An- als auch in Abwesenheit der Nalm-16 Zellen zu. Hierbei dienten PBMCs ohne Kokultivierung mit autologen NK Zellen unter den gleichen Kulturbedingungen als Negativkontrolle. Bei den CIML-NK Zellen konnte keine Steigerung der Proliferation der CD4<sup>+</sup> Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Auch fällt auf, dass über alle Ansätze hinweg die CD8<sup>+</sup> T Zellen sehr viel stärker proliferieren als CD4<sup>+</sup> T Zellen desselben Ansatzes. Eine weitere Steigerung der Proliferation durch die zusätzliche Kultivierung von Nalm-16 Zellen konnte nicht detektiert werden.

Somit konnte lediglich eine leicht gesteigerte Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Kokultur mit naiven und TIML-NK Zellen ermittelt werden. Dies konnte jedoch für CIML-NK Zellen nicht bestätigt werden. Die Unterschiede auf die Proliferationsfähigkeit der T Zellen zwischen den Memory-like und den naiven NK Zellen sind somit sehr gering.



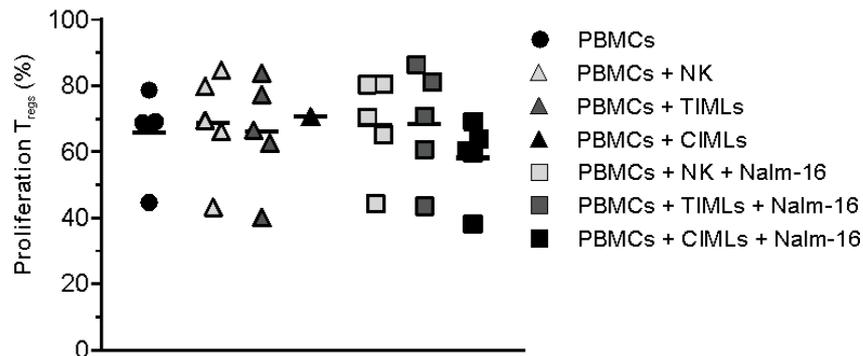
**Abbildung 14 Proliferation an Tag 3 der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Kokultur mit NK Zellen. (A)** Experimentelles Layout zur Konvertierung von humanen, primären NK Zellen nach dem etablierten Modell (hellgrau), sowie die schematische Darstellung der Kokultur aus CD56-depletierten PBMCs mit den autologen, naiven bzw. Memory-like NK Zellen (schwarz). PBMCs und NK Zellen wurden im Verhältnis 1:1 kultiviert, bezogen auf den zuvor durchflusszytometrisch bestimmten Anteil an T Zellen in den PBMCs. Zu Beginn der Kokultur wurden die Zellen mit 1 µg/ml CD3 und 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15 versetzt. Proliferationsanalyse mittels CFSE der **(B)** CD4<sup>+</sup> und **(C)** CD8<sup>+</sup> T Zellen nach Kokultur mit naiven (hellgrau), TIML- (dunkelgrau) bzw. CIML-NK Zellen (schwarz) in An- (Quadrate) und Abwesenheit (Dreiecke) von bestrahlten Nalm-16 Tumorzellen. Als Negativkontrolle diente eine Monokultur der CD56<sup>-</sup>PBMCs (Kreise). Dargestellt sind 2 bzw. 3 unterschiedliche Spender. Der Strich zeigt den Mittelwert aller Spender.

#### 4.8 Proliferation der CD4<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen

Da die Proliferationsunterschiede der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen nach drei Tagen Kokultur mit autologen NK Zellen nur sehr gering waren, sollten in weiteren Untersuchungen die

Unterschiede der immunregulatorischen Fähigkeiten von naiven im Vergleich zu Memory-like NK Zellen in Subpopulationen genauer untersucht werden.

Innerhalb der  $CD4^+$  T Zellen wurden die  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Tregs auf ihre Proliferationsfähigkeit genauer analysiert. Abbildung 15 zeigt die Proliferationsanalyse nach 3 Tagen Kokultur mit NK Zellen in An- oder Abwesenheit der bestrahlten Tumorzelllinie Nalm-16.



**Abbildung 15 Proliferation der  $CD4^+$  Tregs an Tag 3 nach Kokultur mit NK Zellen.** Proliferationsanalyse der  $CD4^+CD25^+FoxP3^+$  Tregs nach Kokultur mit naiven bzw. Memory-like NK Zellen. PBMCs und NK Zellen wurden im Verhältnis 1:1 für 3 Tage kultiviert, bezogen auf den zuvor durchflusszytometrisch bestimmten Anteil an T Zellen in den PBMCs. Zu Beginn der Kokultur wurden die Zellen mit 1  $\mu$ g/ml CD3 sowie 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15 stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine Monokultur der  $CD56^+$ PBMCs (Kreise). Naive NK Zellen (hellgrau), TIML- (dunkelgrau) und CIML-NK Zellen (schwarz) wurden in An- (Quadrate) und Abwesenheit (Dreiecke) von bestrahlten Nalm-16 Tumorzellen mit autologen  $CD56^+$ PBMCs kultiviert. Dargestellt sind 5 unterschiedliche Spender. Der Strich zeigt den Mittelwert aller Spender.

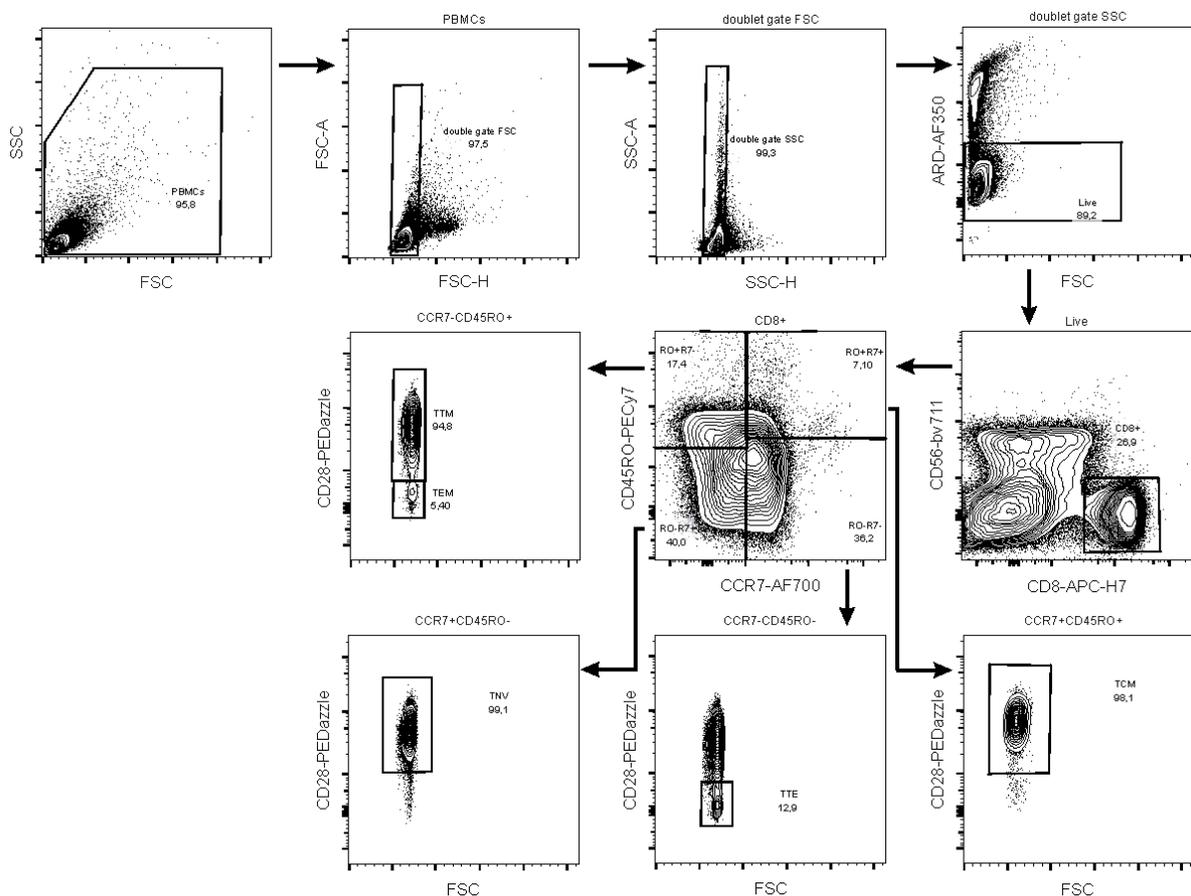
Wie in Abbildung 15 dargestellt, sind zwischen den kultivierten Ansätzen keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen. Eine zusätzliche Kokultivierung von naiven oder Memory-like NK Zellen steigert die Proliferation der Tregs nur in einem sehr geringen Ausmaß. Werden die NK Zellen zusätzlich mit bestrahlten Tumorzellen stimuliert, kann die Proliferation der Tregs nur in Kokultur mit TIML-NK Zellen leicht verstärkt werden. Nach Kokultur mit CIML-NK Zellen und Nalm-16 nimmt die Proliferation leicht ab verglichen mit PBMCs in Monokultur unter gleichen Kulturbedingungen. Eine zusätzliche Kokultivierung mit Nalm-16 Tumorzellen hat dagegen bei naiven NK Zellen keinen Einfluss auf die Proliferationsrate der Tregs.

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine Kokultur mit naiven oder TIML-NK Zellen in An- oder Abwesenheit bestrahlter Tumorzellen die Proliferation der Tregs nur in einem geringen Ausmaß beeinflusst.

## 4.9 Proliferation der CD8<sup>+</sup> T Zell-Subpopulationen

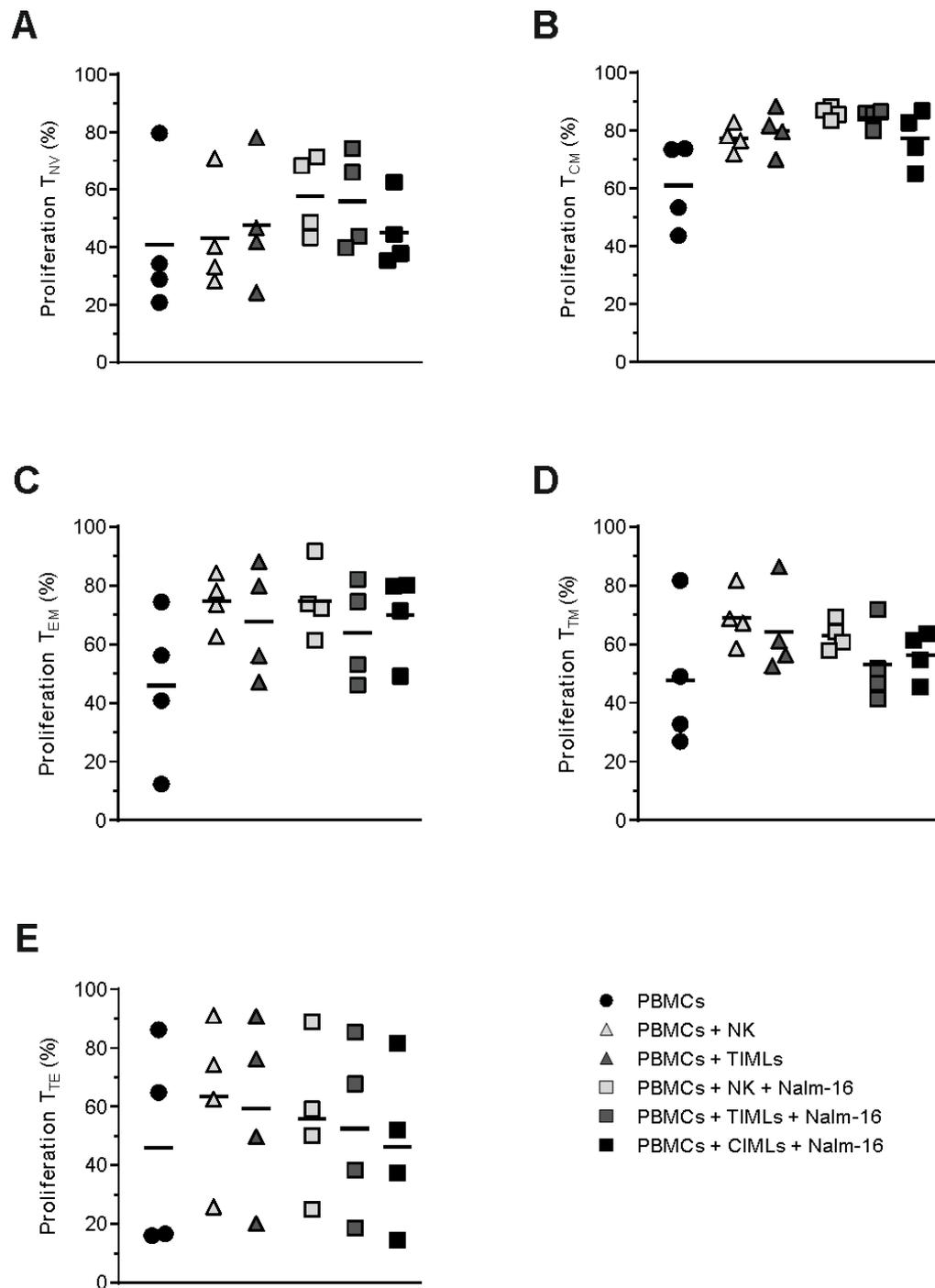
Zusätzlich zur Subpopulation der CD4<sup>+</sup> Tregs sollten auch die CD8<sup>+</sup> Memory-Subpopulationen hinsichtlich ihrer Proliferationsunterschiede nach Kokultur mit naiven bzw. Memory-like NK Zellen untersucht werden.

Für die Identifizierung und Charakterisierung humaner CD8<sup>+</sup> Memory Subpopulationen im Durchflusszytometer wurden die drei Antikörper CD45RO, CD28 und CCR7 verwendet, welche eine Unterscheidung von fünf Subpopulationen in den PBMCs gesunder Spender ermöglichen: naive, zentrale Memory, Effektor-Memory, transitional Memory und terminalen Effektor T Zellen. Die komplexe Gating-Strategie ist in Abbildung 16 dargestellt und zusammengefasst. Dieses Vorgehen ist an die in Mahnke *et al.* etablierte Gating-Strategie angelehnt.



**Abbildung 16** Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Gating-Strategie zur Identifizierung humaner CD8<sup>+</sup> Memory Subpopulationen (angelehnt an Mahnke *et al.*, 2013.). Die Färbung CD45RO, CCR7 und CD28 in Kombination mit CD56 und CD8 jeweils an unterschiedliche Fluorochrome gekoppelt, ermöglicht die Bestimmung der CD8<sup>+</sup> Memory Subpopulationen in naive (TNV), Effektor Memory (TEM), *transitional* Memory (TTM), zentrale Memory (TCM) und terminale Effektor T Zellen (TTE) innerhalb der PBMCs an Tag 3 der Kultur. Dargestellt ist ein repräsentativer Spender.

Die Proliferationsanalyse der CD8<sup>+</sup> Memory-Subpopulationen nach drei Tagen Kokultur mit naiven bzw. Memory-like NK Zellen zeigt, dass sich eine Kokultur von naiven und TIML-NK Zellen positiv auf die Proliferation der hier untersuchten Memory-Subpopulationen auswirkt (Abbildung 17). Während die Proliferation der TCM, TEM TTM und TTE durch Kokultur im Mittel um mindestens 10 % steigt, nimmt die Proliferation naiver CD8<sup>+</sup> T Zellen im Vergleich zu PBMCs in Monokultur unwesentlich zu. Im Unterschied zur Kokultur mit naiven NK Zellen nimmt die Proliferation der TNV und der TCM nach Kokultur mit TIML-NK Zellen in geringem Ausmaß zu (Abbildung 17 A, B). Im Gegensatz hierzu steht die Proliferation der TEM, TTM und TTE: Hier kann die Kokultur mit TIML-NK Zellen die Proliferation der CD8<sup>+</sup> Zellen nicht in dem Ausmaß verstärken wie eine Kokultur mit naiven NK Zellen (Abbildung 17 C, D, E).



**Abbildung 17 Proliferation der CD8<sup>+</sup> T Zell Memory-Subpopulationen an Tag 3 nach Kokultur mit NK Zellen.** Proliferationsanalyse von CD8<sup>+</sup> Memory-T Zellsubpopulationen nach Kokultur mit naiven bzw. Memory-like NK Zellen. CD56-depletierte PBMCs und NK Zellen wurden im Verhältnis 1:1 für 3 Tage kultiviert, bezogen auf den zuvor durchflusszytometrisch bestimmten Anteil an T Zellen in den PBMCs. Zu Beginn der Kokultur wurden die Zellen mit 1 µg/ml CD3 sowie 100 U/ml IL2 und 1 ng/ml IL15 stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine Monokultur der CD56<sup>+</sup>PBMCs (Kreise). Naive NK Zellen (hellgrau), TIML- (dunkelgrau) und CIML-NK Zellen (schwarz) wurden in An- (Quadrate) und Abwesenheit (Dreiecke) von bestrahlten Nalm-16 Tumorzellen mit autologen CD56<sup>+</sup>PBMCs kultiviert. Untersucht wurden **(A)** naive T Zellen (TNV), **(B)** zentrale Memory T Zellen (TCM), **(C)** Effektor Memory T Zellen (TEM), **(D)** transitionale Memory T Zellen (TTM) und **(E)** terminale Effektorzellen (TTE). Dargestellt sind 4 unterschiedliche Spender. Der Strich zeigt den Mittelwert aller Spender.

Werden die Zellen während der Kokultur zusätzlich mit bestrahlten Tumorzellen kokultiviert, zeigt sich bei den TNV und TCM eine weitere Verstärkung der Proliferation verglichen mit den allein kultivierten PBMCs und den CD8<sup>+</sup> Zellen nach Kokultur nur mit NK Zellen. Auf die Proliferationsfähigkeit der TEM hat eine zusätzliche Stimulation mit der Tumorzelllinie keine Auswirkungen. Eine leichte Inhibition der Proliferation der TTM und TTE ist nach Kokultur mit NK Zellen und der bestrahlten Tumorzelllinie zu beobachten. Die Unterschiede in der Proliferation in Anwesenheit bestrahlter Nalm-16 Zellen zwischen naiven und TIML-NK Zellen sind generell eher gering, wobei die Proliferationsrate aller CD8<sup>+</sup> Memory-Subpopulationen, die mit TIML-NK Zellen kokultiviert wurden, niedriger liegt, als mit naiven NK Zellen. Die Proliferationsrate der CD8<sup>+</sup> Zellen ist unter Stimulation mit Tumorzellen nach Kokultur mit CIML-NK Zellen am geringsten, verglichen mit der Kokultur mit naiven oder TIML-NK Zellen. Eine Ausnahme hiervon stellt die Proliferation von TEM und TTM dar: Hier liegt die Proliferationsrate über der nach Kokultur mit TIML-NK Zellen aber unter der Kokultur mit naiven NK Zellen. Die stärkste Proliferation aller getesteten CD8<sup>+</sup> T Zellsubpopulationen geht von den TCM aus, wohingegen die naiven CD8<sup>+</sup> T Zellen am schwächsten proliferiert haben.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Proliferation nach Kokultur mit NK Zellen in allen CD8<sup>+</sup> Memory-Subpopulationen zunimmt. Eine leichte Förderung der Proliferation konnte bei den naiven und TCM nach Kokultur mit TIML detektiert werden, im Vergleich zu einer Kokultur mit naiven NK Zellen. Bei TEM, TTM und TTE konnte eine eher inhibierende Wirkung auf die Proliferation verzeichnet werden. Eine Steigerung der Proliferation durch zusätzliche Kokultivierung von bestrahlten Tumorzellen konnte nur für TNV und TCM gezeigt werden. Bei TEM, TTM und TTE bleibt die Proliferation gleich oder nimmt etwas ab. Die Unterschiede bei der Kokultur mit naiven oder Memory-like NK Zellen in Anwesenheit von Tumorzellen sind sehr gering, wobei eine eher inhibierende Wirkung der Memory-like NK Zellen verglichen mit naiven NK Zellen beobachtet werden konnte.

## 5 Diskussion

Das immunologische Gedächtnis ist normalerweise Eigenschaft der B und T Zellen des adaptiven Immunsystems. In letzter Zeit mehren sich jedoch die Hinweise, dass NK Zellen der angeborenen Immunabwehr ebenfalls Gedächtnis-ähnliche Eigenschaften ausbilden können. Bislang konnten für humane NK Zellen bereits CIML-NK Zellen (Romee *et al.*, 2012) und CMV-induzierte Memory NK Zellen (Della Chiesa *et al.*, 2012; Foley *et al.*, 2012; Guma *et al.*, 2004; Lopez-Verges *et al.*, 2011) beschrieben werden.

Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit unter anderem die adaptiven Eigenschaften von NK Zellen, welche nach Tumorkontakt in TIML-NK Zellen konvertieren, untersucht werden, um die *Graft versus Leukämie* (GvL) Effekte der NK Zellen weiter steigern zu können.

### 5.1 Tumorpriming führt zur Konvertierung in tumorspezifische TIML-NK Zellen

Werden NK Zellen nach magnetischer Isolation für acht Tage mit bestrahlten Leukämiezellen stimuliert, zeigt sich in einem *in vitro* Cytotoxizitätstest eine verglichen mit unstimulierten, naiven NK Zellen erhöhte Funktionalität gegenüber den Zielzellen (Abbildung 5). Wenn auch die Anti-Tumoraktivität dieser TIML-NK Zellen gegenüber den verschiedenen getesteten BCP-ALL aber auch AML Proben unterschiedlich hoch ausfiel, konnte die Funktionalität der TIML-NK Zellen nach vorausgehendem Tumorpriming in allen Cytotoxizitätstests gesteigert werden (Abbildung 5 und Abbildung 6). Die Erhöhung dieser cytotoxischen Aktivität für geprimte NK Zellen, konnte jedoch nur in Cytotoxizitätstests mit Tumorzellen bestätigt werden, welche auch zuvor für die Stimulation verwendet wurden. Diese Aussage gilt sowohl für ein Priming mit einer ALL Probe und einem Cytotoxizitätstest mit einer AML Probe als auch umgekehrt (Abbildung 6). Diese tumorspezifischen, adaptiven Immuneigenschaften der NK Zellen in Zusammenhang mit einem vorausgehenden Tumorpriming, konnte somit erstmals in der AG André beschrieben werden (Pal *et al.*, 2017).

Weitere Experimente belegen ebenfalls, dass eine vorausgehende Stimulation mit Tumorzellen oder Cytokinen IL12, IL15 und IL18 bei NK Zellen zu einer schnelleren und gesteigerten Apoptose-Induktion bei Tumorzellen führt (Abbildung 7). Wie einleitend bereits erwähnt, sind NK Zellen in der Lage sowohl durch den intrinsischen als auch extrinsischen Signalweg Apoptose in der Zielzelle auszulösen. In diesen Versuchen

wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 in Abhängigkeit der Zeit detektiert, welche in der Zielzelle sowohl durch Perforin- als auch TRAIL-vermittelte Cytotoxizität der NK Zellen gespalten und somit aktiviert werden (Elmore, 2007). Somit zeigen auch diese Ergebnisse, dass TIML-NK Zellen eine erhöhte Funktionalität und eine damit verbundene gesteigerte Induktion von Apoptose gegenüber Tumorzellen aufweisen.

Die Erhöhung der Funktionalität im Rahmen einer Stimulation mit Tumorzellen ist bisher nur von Tumor-aktivierten NK Zellen (T-ANKs) bekannt (North *et al.*, 2007). In dieser Studie wurden NK Zellen nach Isolation für 20 h mit der Leukämie-Zelllinie CTV-1 stimuliert und anschließend in Cytotoxizitätstests B-Zelllymphomen, Brustkrebs-Zelllinien, primären Leukämien und soliden Tumoren ausgesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass die gesteigerte Funktionalität der T-ANKs nicht nur auf die Zelllinie CTV-1 beschränkt ist, sondern nicht tumor-spezifisch auch bei den anderen Tumorproben nachgewiesen werden konnte (North *et al.*, 2007). Da keine Tumorspezifität belegt werden konnte und die gesteigerte Aktivität der T-ANKs auf einen kurzen Zeitraum nach der Stimulation mit CTV-1 beschränkt ist, konnte dieser Zelltyp von den hier beschriebenen TIML-NK Zellen abgegrenzt werden. Obwohl der Unterschied in der spezifischen Lyse zwischen den Tumor-geprimten und den unstimulierten NK Zellen an Tag 7 nicht sehr hoch ausfällt, ist er dennoch signifikant. Außerdem deuten andere Ergebnisse der Arbeitsgruppe André darauf hin, dass diese erhöhte Funktionalität auch noch bis zu 21 Tage nach dem Tumorpriming nachweisbar ist, jedoch mit einer verminderten Lyseaktivität verglichen mit Tag 7 (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf eine hohe Bedeutung der gesteigerten und langanhaltenden Cytotoxizität der TIML-NK Zellen hin.

Auch andere Gedächtnis-ähnliche NK Zelltypen weisen eine erhöhte Funktionalität gegenüber Tumorzellen auf. Cytokin-induzierte Memory-like NK Zellen, welche auch in dieser Arbeit bei den Cytotoxizitätsversuchen als Positivkontrolle mitgeführt wurden, zeigen nach einer 16-stündigen Stimulation mit IL12, IL15 und IL18 sowie einer darauffolgenden Kultur von 7 Tagen eine erhöhte Lyse der Leukämie-Zelllinie K562 (Romee *et al.*, 2016). Dies deckt sich mit den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit, denn auch in Cytotoxizitätstests gegen die BCP-ALL Zelllinie Nalm-16 konnte eine erhöhte lytische Aktivität der CIML-NK Zellen detektiert werden (Abbildung 5). Diese erhöhte Lyse gegenüber Tumorzellen wird vor allem durch eine erhöhte IFN- $\gamma$  Sekretion sichergestellt (Romee *et al.*, 2016; Romee *et al.*, 2012). Im Gegensatz hierzu konnte bei den TIML-NK Zellen keine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion detektiert werden, jedoch eine gesteigerte Perforin-Produktion nach BCP-ALL Restimulation an Tag 7 (Pal *et al.*, 2017). Diese erhöhte Perforin-Sekretion ist bislang einzigartig unter den Memory-NK Zellen, da nicht nur für CIML-NK Zellen, sondern auch für CMV-Memory NK Zellen eine gesteigerte

IFN- $\gamma$  Produktion beschreiben wurde (Cooper *et al.*, 2009; Leong *et al.*, 2014; Luetke-Eversloh *et al.*, 2014; Romee *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2012). Perforin ist ein porenbildendes Protein und stellt den Eintritt von Granzymen sicher, die eine Schlüsselrolle in der DNA-Fragmentierung einnehmen und schließlich die Apoptose induzieren (Street *et al.*, 2001). Im Gegensatz dazu kommt IFN- $\gamma$  eher eine große Bedeutung in Anti-Tumorantworten zu als bei der Vermittlung direkter Cytotoxizität. IFN- $\gamma$  verstärkt beispielsweise die Makrophagen-Aktivität, die Antigen-Präsentation, reguliert die Th1 und Th2 Immunantwort und kontrolliert zelluläre Proliferation und Apoptose (Tau *et al.*, 1999).

Zudem zeigte sich die erhöhte Funktionalität der TIML-NK Zellen gegenüber vielen phänotypisch heterogenen kindlichen ALLs und AMLs (Abbildung 8), welche alle untersuchten NK Zell-Liganden in unterschiedlichem Ausmaß exprimieren. Arbeiten von Bryceson *et al.* belegen, dass eine Interaktion von LFA-1 auf NK Zellen mit ihrem Liganden ICAM-1 (oder auch CD54) bei gleichzeitiger Bindung von NKG2D, DNAM-1, 2B4 oder CD2 mit ihren entsprechenden Liganden zur Adhäsion und Polarisierung der Granula in NK Zellen führt und schlussendlich zur erfolgreichen Lyse der Zielzelle (Bryceson, 2005; Bryceson, 2009). Die Liganden für diese Co-Interaktion wurden unter anderem auch auf den in dieser Arbeit verwendeten Leukämiezellen untersucht. Alle verwendeten ALL- und AML-Proben zeigen eine mittlere bis hohe Expression der Marker ICAM-1, CD155, CD122 sowie pan-NKG2D-L. Des Weiteren kann das Expressionsniveau der Liganden von ALL- und AML-Proben eine Erklärung für die unterschiedliche Höhe der Lyse durch NK Zellen sein. Die niedrige Lyse der kindlichen ALL P3B könnte durch die geringe Expression des aktivierenden Liganden CD155 und die hohe Expression des inhibierenden Moleküls HLA-E hervorgerufen worden sein. Im Gegensatz hierzu könnte die hohe Lyse der AML-Probe P18R dadurch erklärt werden, dass die Expression zahlreicher aktivierender Liganden, wie pan-NKG2D-L, CD112 und CD155 ein mittleres bis hohes Niveau auf der Zelloberfläche dieser Leukämie zeigt. Gleichzeitig werden keine HLA-ABC und HLA-E Moleküle auf der Oberfläche der Zielzelle P18R exprimiert und somit kann keine inhibitorische Interaktion mit NK Zellen stattfinden. Diese Herunterregulation der MHC-I Moleküle stellt eine Strategie von Tumorzellen dar, der Immunantwort durch cytotoxische T Zellen zu entgehen, es steigert jedoch gleichzeitig die Anfälligkeit der Tumorzellen für die NK Zell-vermittelte Lyse (Storkus *et al.*, 1991).

Der zugrundeliegende Mechanismus der Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen sollte in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden. Hierfür würde am ehesten die KIR-HLA-ABC Achse in Frage kommen, denn auch die gezeigte Tumorspezifität der TIML-NK Zellen (Abbildung 6) könnte in diesem Zusammenhang erklärt werden. Nicht nur

der TCR auf T Zellen erkennt das gebundene Peptid der MHC-Moleküle (Geluk *et al.*, 1997), auch für NK Zellen konnte bereits belegt werden, dass ein präsentiertes Peptid durch MHC-Moleküle eine maßgebliche Rolle bei der nachfolgenden Aktivierung spielt (Malnati *et al.*, 1995; Rahbari *et al.*, 2015). Dreidimensionale Strukturen von MHC-C1-KIR2DL2 und MHC-C2-KIR2DL1 Komplexen zeigen ähnliche Interaktionen von KIRs mit MHC-I Molekülen wie TCR mit MHC-I (Boyington *et al.*, 2002; Parham, 2005). Kristallstrukturen belegen, dass KIRs hauptsächlich mit der terminalen Carboxyl- und der terminalen Amino-Gruppe interagieren (Boyington *et al.*, 2002). Bereits 1995 konnten Malnati *et al.* zum ersten Mal zeigen, dass KIRs spezifisch an Peptide auf MHC-I Molekülen binden, denn eine Mutation einer einzelnen Aminosäure hatte eine Veränderung der Immunantwort der spezifischen NK Zellen zur Folge (Malnati *et al.*, 1995). Ebenfalls zeigen eigene erste Blockadeversuche der HLA-ABC Moleküle auf Leukämiezellen mittels eines HLA-ABC spezifischen Antiköpers während des Primings keine Erhöhung der Anti-Tumorantwort an Tag 7 (Daten nicht gezeigt). Da jedoch die spezifische Lyse naiver Kontroll-NK Zellen, welche mit dem HLA-ABC spezifischen Antikörper versetzt wurden, verglichen mit Proben ohne Antikörperzugabe erhöht ist, stellt die Durchführung von Blockade-Experimenten mit Hilfe eines MHC-I spezifischen Antikörpers in diesem Zusammenhang kein geeignetes System dar. Des Weiteren konnten aber auch TIML-NK Zellen mit MHC-I defizienten Leukämiezellen generiert werden: NK Zellen nach Priming mit den kindlichen AML Blasten P18R, welche keine MHC-I Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigen ebenfalls eine gesteigerte Anti-Tumorantwort an Tag 7 (Abbildung 6, Abbildung 8). Deshalb ist davon auszugehen, dass die KIR-HLA-ABC Achse bei der Konvertierung nicht beteiligt ist. Weitere Experimente sind nötig, um diese Hypothese zu untermauern. Beispielsweise ist ein HLA-ABC-*Knockout* der Tumorzelllinie Nalm-16 denkbar, mit welcher anschließend Priming-Experimente und Cytotoxizitätstests an Tag 7 durchgeführt werden. Die spezifische Lyse verglichen mit TIML-NK Zellen nach Priming mit HLA-ABC<sup>+</sup> Nalm-16 würde dann Aufschluss über die Beteiligung dieser Achse an der Konvertierung in Memory-like NK Zellen geben. Mit Hilfe solch eines induzierten *Knockouts* im offenen Leserahmen UL40 für HLA-E bei HCMV-infizierten Fibroblasten, konnten Rölle *et al.* zeigen, dass dies zu einer starken Beeinträchtigung der Expansion von NKG2C<sup>+</sup> NK Zellen führt (Rölle *et al.*, 2014). Durch diese Ergebnisse wurde so die Bedeutung der CD94/NKG2C-HLA-E Achse für Memory-like NK Zellen bei HCMV-Infektionen aufgeklärt.

Dadurch, dass diese phänotypisch unterschiedlichen Leukämien alle in der Lage sind die Konvertierung in TIML-NK Zellen zu induzieren, ist es erschwert einen bestimmten Rezeptor oder Signalweg zu ermitteln, der diese Differenzierung auslöst. Aufgrund

dessen sollte in der vorliegenden Arbeit diese Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen genauer untersucht und charakterisiert werden.

## 5.2 Die Konvertierung in TIML-NK Zellen ist Zell-Kontakt abhängig

Nach der Charakterisierung der TIML-NK Zellen mit ihrer erhöhten lytischen Aktivität sollte nun der Frage nachgegangen werden, wie die Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen abläuft. Untersuchungen zum Cytokin-Milieu während der Konvertierung in Memory-like NK Zellen ergaben keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der sekretierten Menge an IFN- $\gamma$ , Granzym-A und -B, Perforin und Granulysin verglichen mit naiven NK Zellen (Abbildung 9). Diese Ergebnisse zeigen jedoch, dass das Cytokinmilieu während der Konvertierung in Memory-like NK Zellen bei TIML-NK Zellen verglichen mit CIML-NK Zellen grundlegend anders zusammengesetzt ist und es sich auch deshalb bei beiden Zelltypen um grundsätzlich unterschiedliche Memory-like Zelltypen handeln muss.

Bei anderen Memory-like NK Zellen ist bereits bekannt, dass Cytokine bei der Konvertierung durchaus eine wichtige Rolle spielen und bei einigen Memory-like Zelltypen konnten diese Cytokine auch schon identifiziert werden. Beispielsweise zeigten Studien in verschiedenen *Knockout*-Mausmodellen, dass die gesteigerte NK Zellantwort bei der Hapten-induzierten CHS mit 2,4-Dinitrofluorobenzol auf IFN- $\gamma$ , IL12 und IFN- $\alpha$  beruhen (Majewska-Szczepanik *et al.*, 2013). In der gleichen Studie konnte für die IFN- $\gamma$  Produktion durch Leber-ständige NK Zellen eine Abhängigkeit von der Interaktion des Rezeptors CXCR6 und dessen Ligand CXCL16 dargestellt werden (Majewska-Szczepanik *et al.*, 2013; Paust *et al.*, 2010). Wurde entweder der Rezeptor CXCR6 oder das membranständige Chemokin CXCL16 mittels Antikörper blockiert, nahm die IFN- $\gamma$  Produktion ab (Majewska-Szczepanik *et al.*, 2013). Auch für CMV-Memory NK Zellen konnte in IL12R-defizienten Mäusen belegt werden, dass während einer MCMV-Infektion NK Zellen nicht in der Lage waren zu expandieren und Memory-NK Zellen auszubilden (Sun *et al.*, 2012). Die Notwendigkeit des Cytokins IL12 ist nicht nur in der Maus im Zusammenhang mit einer CMV-Infektion bestätigt worden, sondern auch im Menschen. Rölle *et al.* zeigten in einer Kokultur aus Monozyten, welche IL12 als Reaktion auf HCMV-induzierte Fibroblasten sekretierten, dass die NKG2C<sup>+</sup> Subpopulation der NK Zellen in Anwesenheit eines IL12-neutralisierenden Antikörpers nicht expandiert (Rölle *et al.*, 2014). Daher ist das Cytokin IL12 zusätzlich zur zellulären Interaktion für die Generierung von CMV-induzierten Memory NK Zellen sowie dem Schutz während einer CMV-Infektion notwendig. Cytokine sind aber nicht nur für die Expansion oder die Ausbildung einer

zweiten Immunantwort essentiell, pro-inflammatorische Cytokine selbst sind in der Lage NK Zellen mit Memory-like Eigenschaften in Abwesenheit eines Antigens zu generieren. Die Stimulation von murinen und humanen NK Zellen mit IL12, IL15 und IL18 führt zu einer erhöhten IFN- $\gamma$  Produktion (Cooper *et al.*, 2009; Romee *et al.*, 2012) und zumindest bei humanen NK Zellen zu einer erhöhten *in vitro* Cytotoxizität gegenüber K562 Tumorzellen (Keppel *et al.*, 2013; Romee *et al.*, 2016). Auf Grund dieser Studien ist davon auszugehen, dass es sich bei der Konvertierung von naiven in Memory-like NK Zellen um einen komplexen Prozess handelt, der - zumindest für die bisher beschriebenen Memory-like NK Zelltypen - auf Cytokine in An- oder Abwesenheit bestimmter Rezeptor-Liganden Interaktionen angewiesen ist.

Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob allein die Sekretion von Cytokinen durch Tumorzellen oder den NK Zellen selbst während des Primings die Konvertierung in TIML-NK Zellen induziert. Es ist bereits bekannt, dass Tumorzellen in der Lage sind Cytokine wie IL10 oder TCF- $\beta$  zu sekretieren und so die NK Zellantwort zu beeinflussen (Rouce *et al.*, 2016; Stringaris *et al.*, 2014). Deshalb sollte während der Kokultur der direkte Zellkontakt zwischen NK Zellen und Leukämiezellen verhindert werden. Die Kultivierung von naiven NK Zellen und Tumorzellen getrennt durch eine Transwell-Membran führte in Cytotoxizitätstests an Tag 7 zu keiner Erhöhung der spezifischen Lyse (Abbildung 10). Dies legt die Vermutung nahe, dass NK Zellen auf direkten Zell-Zellkontakt mit Tumorzellen angewiesen sind und der Austausch von Cytokinen nicht ausreicht, um die Generierung in TIML-NK Zellen zu induzieren. Auch in weiteren Untersuchungen zu den T-ANKs von North *et al.* konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden: wurden zur Generierung der T-ANKs mit der Zelllinie CTV-1 Transwell-Einsätze verwendet, so konnte keine lytische Zellaktivität der T-ANKs gegenüber verschiedener Tumorzelllinien mehr dokumentiert werden (North *et al.*, 2007).

Im nächsten Schritt wurde deshalb die Bedeutung der Rezeptor-Liganden-Interaktion ohne kostimulatorische Signale untersucht, um der Frage nachzugehen, ob die Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen allein durch die Interaktion von Rezeptoren ohne etwaige Beteiligung sekretierter Cytokine erfolgt. Hierfür wurden membranständige Proteine der Tumorzelllinie Nalm-16 isoliert und für acht Tage mit naiven NK Zellen kokultiviert. Ein abschließender Cytotoxizitätstest zeigte eine ähnlich hohe NK Zell-Funktionalität gegenüber vitalen Nalm-16 Zellen wie NK Zellen, die zuvor mit bestrahlten Nalm-16 Zellen stimuliert wurden (Abbildung 10). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Konvertierung in TIML-NK Zellen ohne Cytokine stattfindet und dass keine neu exprimierten Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen für die Generierung in TIML-NK Zellen notwendig sind. Um die Aussage zu bestätigen, sollte die Spenderanzahl weiter

erhöht werden. Außerdem könnten in weitergehenden Experimenten, wie in der Studie von North *et al.*, NK Zellen mit Formaldehyd-fixierten Tumorzellen kokultiviert werden (North *et al.*, 2007). Auf diese Weise kann ebenfalls ein notwendiger Einfluss von neu exprimierten Rezeptoren und kostimulatorischen Signalen ausgeschlossen und gleichzeitig diese wichtige Aussage methodisch erweitert untersucht werden.

Somit kann davon ausgegangen werden, dass bei der Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen der direkte Zell-Zellkontakt zwischen NK Zellen und Tumorzellen benötigt wird. Da kostimulatorische Signale, wie beispielsweise Cytokine, eine eher untergeordnete Rolle spielen, ist es nicht von Bedeutung ob die verwendete Tumorzelle während des Primings tot oder vital ist.

### **5.3 Die NKG2D/IL15 Achse ist bei der Konvertierung nicht beteiligt**

Da vorausgehende Experimente zeigten, dass die Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen nicht auf Cytokinen, sondern auf direktem Zell-Zellkontakt beruht (Abbildung 10 und Abbildung 11), wurde zunächst die NKG2D/IL15 Achse im Zusammenhang mit der Generierung von TIML-NK Zellen untersucht. Denn IL15 kann die Expression von NKG2D auf humanen NK Zellen hochregulieren (Sutherland *et al.*, 2002) und auch die intrazelluläre Signalweiterleitung von NKG2D ist von dem IL15R abhängig (Horng *et al.*, 2007). Die Kinase Jak3, welche durch den IL15R aktiv wird, ist auch dafür verantwortlich das an NKG2D gekoppelte Adapterprotein DAP10 zu phosphorylieren. Somit ist die DAP-10 vermittelte Aktivierung von NK Zellen auf IL15, dessen Rezeptor und der Kinase Jak3 abhängig (Horng *et al.*, 2007). Des Weiteren werden Tumorzelllinien, welche NKG2D-Liganden exprimieren, mit gesteigerter Affinität lysiert (Bauer *et al.*, 1999; Cosman *et al.*, 2001; Diefenbach *et al.*, 2000), was die Bedeutung des NKG2D Rezeptors für die Cytotoxizität von NK Zellen unterstreicht. Auch in der T Zellbiologie sind diese Zusammenhänge zwischen IL15 und dem Rezeptor NKG2D bekannt, um die Bildung von CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen zu steigern (Huntington *et al.*, 2007; Wensveen *et al.*, 2013).

Zur Untersuchung der NKG2D/IL15 Achse wurde das bestehende Modell zur Tumorstimulation naiver NK Zellen (Pal *et al.*, 2017) durch die Zugabe eines NKG2D-spezifischen Antikörpers so erweitert, dass der NKG2D-Rezeptor auf der Oberfläche der NK Zellen blockiert war. Gleichzeitig wurde sichergestellt, dass dieser Rezeptor im abschließenden Cytotoxizitätstest wieder frei vorlag, um eine Beeinträchtigung in der Lyse-Kapazität der NK Zellen auszuschließen. Die Ergebnisse zeigen, dass die spezifische Lyse der NK Zellen zwischen den blockierten und unblockierten, naiven NK

Zellen vergleichbar hoch liegt. Somit hat die in dieser Arbeit etablierte NKG2D Blockade durch Antikörperzugabe keinerlei Auswirkungen auf die Funktionalität von NK Zellen an Tag 7. Des Weiteren konnte belegt werden, dass blockierte TIML-NK Zellen die Tumorzellen P3B signifikant besser lysieren als naive, blockierte NK Zellen. Eine Blockade des NKG2D Rezeptors während des Primings hebt somit die Konvertierung in TIML-NK Zellen nicht auf. In weiteren Experimenten konnte außerdem keine Änderung der IL15 Expression in Zellkulturüberständen detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dies lässt vermuten, dass die NKG2D/IL15 Achse nicht am Priming-Prozess beteiligt ist. Andere Ergebnisse der Arbeitsgruppe André bestätigen diese Vermutung, da die ALL-Probe P31G trotz fehlender NKG2D-Liganden in der Lage ist, TIML-NK Zellen zu generieren, was sich in einer höheren Lyse verglichen mit naiven NK Zellen zeigt (Pal *et al.*, 2017). Die Arbeitsgruppe Lanier geht ebenfalls davon aus, dass die NKG2D/IL15 Achse eher nicht an der Konvertierung von Effektor in Memory-like NK Zellen beteiligt ist, was von den hier dargestellten Ergebnissen unterstützt wird (Cerwenka *et al.*, 2016).

#### **5.4 TIML-NK Zellen besitzen keinen distinkten Phänotyp**

In der vorliegenden Arbeit wurden TIML-NK Zellen auf die Änderung in der Expression von CD25, NKp30, NKp46, NKG2C, NKG2D, CD16, CD57, KLRG1 und CXCR6 untersucht, was jedoch keine Unterschiede verglichen mit unstimulierten NK Zellen ergab (Abbildung 13) (Pal *et al.*, 2017). Diese Ergebnisse stimmen mit der Literatur überein, dass Memory NK Zellen phänotypisch nicht von naiven NK Zellen unterschieden werden können (Sun *et al.*, 2011). Nichtsdestotrotz konnte für Cytokin- und HCMV-induzierte Memory-like NK Zellen ein spezifischer Phänotyp beschrieben werden. Die Untersuchung des Expressionsniveaus für CD25 sollte deshalb einen Vergleich zwischen TIML- und CIML-NK Zellen ermöglichen. Denn CIML-NK Zellen zeichnen sich nach Aktivierung mit IL12, IL15 und IL18 unter anderem durch die gesteigerte Expression von CD25 aus, was es diesen ermöglicht bereits auf geringe Konzentrationen IL2 mit einer erhöhten Funktionalität und IFN- $\gamma$  Produktion zu reagieren (Leong *et al.*, 2014). Zumindest die Hochregulation des IL2R (CD25) konnte in der vorliegenden Arbeit für CIML-NK Zellen bestätigt werden. TIML-NK Zellen zeigen im Gegensatz zu CIML-NK Zellen keine gesteigerte Expression des CD25 Rezeptors. Die Expression der Rezeptoren NKp30 und NKp46 ist bei TIML-NK Zellen leicht erhöht. Die Interaktion dieser Rezeptoren zusammen mit kostimulatorischen Rezeptoren wie NKG2D kann durch die Bindung stress-induzierter Liganden auf Zielzellen die Degranulation von NK Zellen induzieren (Carapito *et al.*, 2017). Aus diesem genannten Grund wurde das Expressionsniveau von NKp30, NKp46 und NKG2D sowohl auf naiven als auch TIML-NK Zellen analysiert. Des Weiteren ist

NKG2D ein wichtiger Cytotoxizitäts-vermittelnder Rezeptor. Hierbei werden die Liganden MIC-A, MIC-B und ULBPs erkannt, welche nach HSCT sowohl auf malignen als auch gesunden Zellen exprimiert werden (Gasser *et al.*, 2005; Salih *et al.*, 2003). Somit nimmt der Rezeptor NKG2D auf NK Zellen eine wichtige Rolle zur Unterscheidung zwischen körpereigenen und -fremd ein, was schließlich die Balance zwischen GvL und GvHD nach HSCT maßgeblich beeinflusst (Carapito *et al.*, 2017). Auch HCMV-induzierte Memory NK Zellen können durch die Expression von CD94/NKG2C, CD57 und bei Abwesenheit von NKG2A von ihren naiven NK Zellen abgegrenzt werden (Lopez-Verges *et al.*, 2011). Deshalb wurde auch die Expression des Rezeptors NKG2C auf TIML-NK Zellen analysiert, um eine Beteiligung dieses Oberflächenmoleküls bei der Konvertierung in TIML-NK Zellen zu klären. Im Gegensatz zu HCMV-induzierten Memory NK Zellen konnte keine Änderung in der NKG2C Expression auf TIML-NK Zellen detektiert werden. CD57 und KLRG1 sind wichtige Marker in der Reifung und Seneszenz der NK Zellen und konnten bei CMV-induzierten Memory NK Zellen Aufschluss über die klonale Expansion der CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> NK Zellsubpopulation geben (Cichocki *et al.*, 2016; Lopez-Verges *et al.*, 2011). Auch in der Regulation von CD57 zeigen TIML-NK Zellen keine Veränderungen zu unstimulierten NK Zellen. Ebenfalls konnte die Analyse des Expressionsniveaus von KLRG1 keine Unterschiede bei TIML-NK Zellen aufdecken. Murine Memory NK Zellen nach MCMV-Infektion lassen sich nicht nur anhand der erhöhten Ly49H Expression von ihren naiven NK Zellen unterscheiden, sondern Ly49H<sup>+</sup> Memory NK Zellen zeigen auch eine gesteigerte KLRG1 Expression, was vermutlich die niedrigere Aktivierungstoleranz dieser Zellen erklärt (Sun *et al.*, 2009). Außerdem wurde noch der Marker CXCR6 auf TIML-NK Zellen analysiert, welcher von Hapten-induzierten Memory NK Zellen bekannt ist das Überleben der Memory NK Zellen und die Funktionalität zu vermitteln (O'Leary *et al.*, 2006; Paust *et al.*, 2010). Da auch dieser Marker keine Veränderung in seiner Expression nach Konvertierung in TIML-NK Zellen aufwies, konnten bislang keine phänotypischen Unterscheide zwischen naiven und TIML-NK Zellen aufgedeckt werden.

## 5.5 Immunregulatorische Funktionen von Memory-like NK Zellen

Die HSCT stellt eine mögliche Behandlung von Hochrisiko-Patienten mit einer Vielzahl von hämatologischen Krebserkrankungen dar, die eine hohes Risiko für einen Rückfall haben oder resistent gegenüber Chemotherapeutika sind. Nach der HSCT eines Patienten mit Leukämieerkrankung spielen GvL Effekte eine große Rolle, wobei die Lymphozyten des Spenders einzelne, verbliebende Leukämiezellen erkennen und lysieren (Verneris, 2013). Diese Effekte wurden meist allogenen T Zellen zugeschrieben.

Aber auch andere Lymphozyten, wie NK Zellen, tragen zu GvL Effekten nach Transplantation bei (Ruggeri *et al.*, 2015). In diesem Zusammenhang sollten Memory-like NK Zellen auf eine mögliche Änderung in ihren immunregulatorischen Eigenschaften verglichen mit naiven NK Zellen untersucht werden. Hierfür wurde ein *in vitro* Kokulturmodell aus NK Zellen und autologen PBMCs, welche zuvor CD56 depletiert wurden, unter anti-CD3 Antikörper-Stimulation etabliert. Nach der Kokultur von drei Tagen wurden abschließend die Proliferation der T Zellen bestimmt, um auf mögliche stimulierende oder inhibierende Einflüsse der Memory-like NK Zellen rückzuschließen. In der Studie von Assarsson *et al.* wurde bereits eine stimulierende Wirkung von murinen NK Zellen auf die Proliferation CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen beschrieben, welche auf der Interaktion von 2B4 der NK Zellen mit CD48 auf T Zellen beruhte. Diese Stimulation war allerdings von spezifischen Antigenen, welche durch DCs präsentiert wurden, oder IL2 und einem anti-CD3 Antikörper abhängig (Assarsson *et al.*, 2004). Auch in dem hier etablierten Kokulturmodell aus NK Zellen und autologen CD56<sup>-</sup>PBMCs wurde zur Stimulation ein anti-CD3 Antikörper verwendet. Die Proliferationsunterschiede nach Kultivierung mit naiven oder TIML-NK Zellen waren allerdings nur sehr gering (Abbildung 14). Eine zusätzliche Kokultivierung der Ansätze mit bestrahlten Tumorzellen Nalm-16 zeigte keine weitere Steigerung der Proliferation CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T Zellen. Da eine Studie belegt, dass durch die NK Zell-vermittelte Lyse und Zellfragment-Freisetzung CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen in ihrer Cytotoxizität gesteigert werden konnten (Krebs *et al.*, 2009), wurde auch hier für TIML-NK Zellen eine erhöhte Antigen-Freisetzung und eine damit verbundene erhöhte Aktivierung und Proliferation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen erwartet. Jedoch konnten keine Unterschiede in der Proliferation der T Zellen zwischen der Kultivierung mit naiven oder TIML-NK Zellen sowohl in An- und Abwesenheit von Tumorzellen verzeichnet werden.

CIML-NK Zellen zeichnen sich nach Restimulation mit Cytokinen oder Tumorzellen durch eine erhöhte IFN- $\gamma$  Produktion aus, was in der Kokultur mit PBMCs zu einer Förderung der DC Reifung mit einer verstärkten Kostimulation und IL12 Synthese führt (Adam *et al.*, 2005; Gerosa *et al.*, 2002). Dies sollte einen stimulierenden Einfluss auf die Proliferation der CD4<sup>+</sup> T Zellen haben. Die hier dargestellten Ergebnisse deuten aber auf einen eher geringen Einfluss von CIML-NK Zellen auf T Zellen bei Anwesenheit von Tumorzellen hin.. Für eine fundierte Aussage über die immunregulatorischen Funktionen von Memory-like NK Zellen auf die Proliferation von T Zellen, sind weitere Spender nötig, um trotz der hohen Streuung der Ergebnisse eine Aussage für eine stimulierende oder inhibierende Wirkung auf T Zellen zu treffen.

Durch die Vielzahl verschiedener Subpopulation der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen, könnten mögliche Änderungen in der Proliferation überdeckt und somit nicht detektiert worden sein. Aus diesem Grund sollte in weiteren Proliferationsanalysen speziell auf die Tregs und CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen fokussiert werden.

Wie einleitend bereits erwähnt, sind Tregs in der Lage Immunantworten zu supprimieren und sind für die immunologische Selbsterkennung verantwortlich (Gershon *et al.*, 1971; Pedroza-Pacheco *et al.*, 2013). Des Weiteren ist bekannt, dass die Anzahl der Tregs invers mit dem Fortschreiten verschiedener Krebserkrankungen wie Prostatakarzinomen oder Darmkrebs korreliert (Dobrovina *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004). Eine Veränderung in der Proliferation von Tregs durch naive oder TIML-NK Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit nach Kokultur mit PBMCs jedoch nicht beschrieben werden. Lediglich eine leichte Abnahme der Treg Proliferationsrate nach Kokultur von CIML-NK Zellen mit PBMCs in Anwesenheit von Nalm-16 Zellen verglichen mit naiven NK Zellen ist zu beobachten (Abbildung 15). Während Daten aus der Literatur, die eine funktionelle Veränderung der Tregs durch NK Zellen beschreiben, selten sind, ist der umgekehrte Einfluss auf NK Zellen gut beschrieben. So ist bereits bekannt, dass Tregs durch sekretiertes TGF- $\beta$  sowohl die cytotoxische Funktion von NK Zellen als auch die Funktion und Reifung von DCs inhibieren können (Ghiringhelli *et al.*, 2005; Misra *et al.*, 2004). Um den Einfluss von TIML-NK Zellen auf Tregs und die daraus resultierenden Folgen für mögliche adoptive Immuntherapien einschätzen zu können, sind noch weitere Untersuchungen dieser direkten oder auch Cytokin-vermittelten Interaktion nötig. Beispielsweise könnte sich hier ein inhibierender Einfluss auf die Proliferation der Tregs und eine damit verbundene verminderte Produktion von TGF- $\beta$  durch Memory-like NK Zellen positiv auf die Funktionalität und Proliferation der NK Zellen auswirken.

Wird die Proliferation CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen nach Kokultur mit naiven bzw. Memory-like NK Zellen betrachtet, ist eine leicht fördernde Wirkung von TIML-NK Zellen verglichen mit naiven NK Zellen für TCM und naiven T Zellen zu verzeichnen. CIML-NK Zellen allerdings zeigen eine leichte Hemmung der TCM Zell-Proliferation, was im Gegensatz zu den Ergebnissen von Soderquest *et al.* steht. In dieser Studie induziert eine Depletion von NK Zellen eine Expansion und Differenzierung in TCM Memory T Zellen, welche eine bedeutende Rolle in der Anti-Tumorantwort als OVA-spezifische TCM spielen (Soderquest *et al.*, 2011). Des Weiteren zeichnen sich TCM Memory T Zellen durch erhöhte Proliferationsfähigkeit aus (Sallusto *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit konnten dies bestätigen, da die Subpopulation der TCM Zellen die höchsten Proliferationsraten verglichen mit den anderen hier getesteten CD8<sup>+</sup> Memory T Zellen zeigen. Im Gegensatz zu TEM haben TCM Memory T Zellen nur eine geringe

inflammatorische und zytotoxische Aktivität (Sallusto *et al.*, 2004) und die Bedeutung dieser Subpopulation wird daher für eine direkte Verstärkung der GvL Effekte eher als gering eingestuft. TEM Memory T Zellen zeichnen sich jedoch mit schnellen Effektorfunktionen aus (Sallusto *et al.*, 2004). Die Proliferation konnte durch Kokultur mit TIML-NK Zellen inhibiert, mit CIML-NK Zellen leicht gefördert werden. Die TEM Memory T Zellen könnten durch ihre Effektorfunktionen einen vielversprechenden Effekt auf GvL Reaktionen haben und der immunregulatorische Einfluss von Memory-like NK Zellen sollten daher in weiteren Experimenten untersucht werden. CD8<sup>+</sup> TTE Memory T Zellen zeigen laut Literatur eine starke Expansion nach IL15 Exposition und schließlich eine schwache Proliferation und geringe Funktionsfähigkeit (Geginat *et al.*, 2003; Henson *et al.*, 2009). Dies konnte durch die vorliegenden Ergebnisse aber nicht bestätigt werden, denn hier zeigen TTE Memory T Zellen eine mittlere bis hohe Proliferation.

Eine zusätzliche Kokultivierung mit bestrahlten Tumorzellen stimulierte in diesem Kokulturmodell die Proliferation von TNV, TCM und TTE leicht. Dieser fördernde Effekt könnte wieder durch die Kreuzpräsentation von DCs erklärt werden (Krebs *et al.*, 2009), da die Lyse der Tumorzellen durch NK Zellen zur Freisetzung von Tumorantigenen führt, welche von DCs auf MHC-I Molekülen präsentiert werden könnten. In diesem Zusammenhang würde eine gesteigerte Proliferation nach Kokultur mit TIML-NK Zellen erwartet werden, da es durch TIML-NK Zellen zu einer erhöhten Lyse der Zielzelle und somit einer stärkeren Antigen-Freisetzung kommt. Diese Erwartung konnte in der hier vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigt werden.

Insgesamt konnte keine eindeutige Veränderung der immunregulatorischen Funktion von Memory-like NK Zellen auf T Zellen im Vergleich zu naiven NK Zellen hinsichtlich der Proliferation ermittelt werden. Um NK Zell-vermittelte GvL Effekte nach HSCT weiter zu optimieren und denkbare schädliche Reaktionen wie eine GvHD auszuschließen, sind weitere Untersuchungen und Analysen der Interaktion von Memory-like NK Zellen mit T Zellen nötig.

## 5.6 Fazit und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein vorausgehender Tumorkontakt die Konvertierung von Effektor in TIML-NK Zellen auslöst. Diese TIML-NK Zellen zeichnen sich durch eine erhöhte, langanhaltende, tumorspezifische Funktionalität aus. Diese Konvertierung wird vermutlich nicht durch Cytokine initiiert, sondern beruht auf Rezeptor-Liganden Interaktionen. Die Beteiligung der NKG2D/IL15 Achse an der Generierung der TIML-NK Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt

werden. Da alle Spender in der hier vorliegenden Arbeit nicht nach möglichen KIR KIRL Interaktionen ausgewählt wurden, spricht dies für die These, dass ein Priming mit Tumorzellen hiervon unabhängig stattfindet und somit die generellen GvL Effekte gesteigert werden können. Die Generierung von TIML-NK Zellen bietet somit neue Ansätze und Perspektiven zukünftige Protokolle für den adoptiven Zelltransfer in der Therapie von kindlichen Leukämien zu verbessern.

Trotzdem bleiben noch viele offene Fragen, die im Zusammenhang mit TIML-NK Zellen zukünftig beantwortet werden müssen: Der zugrundeliegende Mechanismus der Konvertierung von Effektor in TIML-NK Zellen konnte noch nicht geklärt werden, vor allem die hierbei beteiligten Antigen-spezifischen Rezeptor-Liganden Interaktionen sind unbekannt. Auch die Ausbildung eines bestimmten Phänotyps nach Konvertierung in TIML-NK Zellen konnte bislang nicht beschrieben werden. Dies würde die Identifizierung dieser Memory-like NK Zellen auch für weitergehende Experimente, beispielsweise *in vivo*, erleichtern. Des Weiteren kann zum jetzigen Zeitpunkt der immunregulatorische Einfluss dieser TIML-NK Zellen auf Zellen des adaptiven Immunsystems nicht eingeschätzt werden. Deshalb sollte die Interaktion zwischen TIML-NK Zellen und speziell T Zellen weiter untersucht werden, um GvL Effekte voll auszuschöpfen und die Einleitung potentiell gefährdender Immunantworten wie einer GvHD auszuschließen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adam, C., King, S., Allgeier, T., Braumuller, H., Luking, C., Mysliwietz, J., Kriegeskorte, A., Busch, D. H., Rocken, M. and Mocikat, R. (2005). DC-NK cell cross talk as a novel CD4+ T-cell-independent pathway for antitumor CTL induction. *Blood*, 106(1), 338-344.
- Afkarian, M., Sedy, J. R., Yang, J., Jacobson, N. G., Cereb, N., Yang, S. Y., Murphy, T. L. and Murphy, K. M. (2002). T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol*, 3(6), 549-557.
- Andersen, M. H., Schrama, D., Thor Straten, P. and Becker, J. C. (2006). Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol*, 126(1), 32-41.
- Annesley, C. E. and Brown, P. (2015). Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther Adv Hematol*, 6(2), 61-79.
- Annunziato, F., Cosmi, L., Santarasci, V., Maggi, L., Liotta, F., Mazzinghi, B., Parente, E., Fili, L., Ferri, S., Frosali, F., Giudici, F., Romagnani, P., Parronchi, P., Tonelli, F., Maggi, E. and Romagnani, S. (2007). Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med*, 204(8), 1849-1861.
- Arase, H., Mocarski, E. S., Campbell, A. E., Hill, A. B. and Lanier, L. L. (2002). Direct recognition of cytomegalovirus by activating and inhibitory NK cell receptors. *Science*, 296(5571), 1323-1326.
- Ardolino, M., Zingoni, A., Cerboni, C., Cecere, F., Soriani, A., Iannitto, M. L. and Santoni, A. (2011). DNAM-1 ligand expression on Ag-stimulated T lymphocytes is mediated by ROS-dependent activation of DNA-damage response: relevance for NK-T cell interaction. *Blood*, 117(18), 4778-4786.
- Artis, D. and Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517(7534), 293-301.
- Assarsson, E., Kambayashi, T., Schatzle, J. D., Cramer, S. O., von Bonin, A., Jensen, P. E., Ljunggren, H. G. and Chambers, B. J. (2004). NK cells stimulate proliferation of T and NK cells through 2B4/CD48 interactions. *J Immunol*, 173(1), 174-180.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M. W., Coffman, R. L. and Powrie, F. (1999). An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med*, 190(7), 995-1004.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 285(5428), 727-729.

- Baychelier, F., Sennepin, A., Ermonval, M., Dorgham, K., Debre, P. and Vieillard, V. (2013). Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood*, 122(17), 2935-2942.
- Beziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debre, P., Bjorkstrom, N. K., Malmberg, K. J., Marcellin, P. and Vieillard, V. (2012). CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol*, 42(2), 447-457.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Pende, D., Millo, R., Moretta, L., Bottino, C. and Moretta, A. (2000). Human natural killer cell activating receptors. *Mol Immunol*, 37(17), 1015-1024.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C. and Moretta, A. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol Rev*, 181, 203-214.
- Bjorkstrom, N. K., Lindgren, T., Stoltz, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., Michaelsson, J., Malmberg, K. J., Klingstrom, J., Ahlm, C. and Ljunggren, H. G. (2011). Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med*, 208(1), 13-21.
- Bodduluru, L. N., Kasala, E. R., Madhana, R. M. and Sriram, C. S. (2015). Natural killer cells: the journey from puzzles in biology to treatment of cancer. *Cancer Lett*, 357(2), 454-467.
- Bosselut, R., Zhang, W., Ashe, J. M., Kopacz, J. L., Samelson, L. E. and Singer, A. (1999). Association of the adaptor molecule LAT with CD4 and CD8 coreceptors identifies a new coreceptor function in T cell receptor signal transduction. *J Exp Med*, 190(10), 1517-1526.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M. and Moretta, A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, 198(4), 557-567.
- Boyington, J. C. and Sun, P. D. (2002). A structural perspective on MHC class I recognition by killer cell immunoglobulin-like receptors. *Mol Immunol*, 38(14), 1007-1021.
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. and Levin, S. D. (2009). The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*, 206(7), 1495-1503.
- Brenchley, J. M., Karandikar, N. J., Betts, M. R., Ambrozak, D. R., Hill, B. J., Crotty, L. E., Casazza, J. P., Kuruppu, J., Migueles, S. A., Connors, M., Roederer, M., Douek, D. C. and Koup, R. A. (2003). Expression of CD57

- defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood*, 101(7), 2711-2720.
- Bromley, S. K., Iaboni, A., Davis, S. J., Whitty, A., Green, J. M., Shaw, A. S., Weiss, A. and Dustin, M. L. (2001). The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat Immunol*, 2(12), 1159-1166.
- Brunetta, E., Fogli, M., Varchetta, S., Bozzo, L., Hudspeth, K. L., Marcenaro, E., Moretta, A. and Mavilio, D. (2010). Chronic HIV-1 viremia reverses NKG2A/NKG2C ratio on natural killer cells in patients with human cytomegalovirus co-infection. *AIDS*, 24(1), 27-34.
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112(3), 461-469.
- Campbell, K. S. and Hasegawa, J. (2013). Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol*, 132(3), 536-544.
- Carapito, R., Aouadi, I., Ilias, W. and Bahram, S. (2017). Natural Killer Group 2, Member D/NKG2D Ligands in Hematopoietic Cell Transplantation. *Front Immunol*, 8, 368.
- Cerboni, C., Zingoni, A., Cippitelli, M., Piccoli, M., Frati, L. and Santoni, A. (2007). Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood*, 110(2), 606-615.
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2016). Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*, 16(2), 112-123.
- Chan, C. J., Smyth, M. J. and Martinet, L. (2014). Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ*, 21(1), 5-14.
- Chaplin, D. D. (2010). Overview of the immune response. *J Allergy Clin Immunol*, 125(2 Suppl 2), S3-23.
- Chien, Y. H., Gascoigne, N. R., Kavaler, J., Lee, N. E. and Davis, M. M. (1984). Somatic recombination in a murine T-cell receptor gene. *Nature*, 309(5966), 322-326.
- Cichocki, F., Cooley, S., Davis, Z., DeFor, T. E., Schlums, H., Zhang, B., Brunstein, C. G., Blazar, B. R., Wagner, J., Diamond, D. J., Verneris, M. R., Bryceson, Y. T., Weisdorf, D. J. and Miller, J. S. (2016). CD56<sup>dim</sup>CD57<sup>+</sup>NKG2C<sup>+</sup> NK cell expansion is associated with reduced leukemia relapse after reduced intensity HCT. *Leukemia*, 30(2), 456-463.
- Colucci, F., Caligiuri, M. A. and Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol*, 3(5), 413-425.

- Cooper, M. A., Elliott, J. M., Keyel, P. A., Yang, L., Carrero, J. A. and Yokoyama, W. M. (2009). Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(6), 1915-1919.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11), 633-640.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. and Chalupny, N. J. (2001). ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 14(2), 123-133.
- Couper, K. N., Blount, D. G. and Riley, E. M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol*, 180(9), 5771-5777.
- Crouse, J., Xu, H. C., Lang, P. A. and Oxenius, A. (2015). NK cells regulating T cell responses: mechanisms and outcome. *Trends in Immunology*, 36(1), 49-58.
- Cui, W. and Kaech, S. M. (2010). Generation of effector CD8+ T cells and their conversion to memory T cells. *Immunol Rev*, 236, 151-166.
- Curtsinger, J. M., Valenzuela, J. O., Agarwal, P., Lins, D. and Mescher, M. F. (2005). Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. *J Immunol*, 174(8), 4465-4469.
- Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature*, 334(6181), 395-402.
- Della Chiesa, M., Falco, M., Podesta, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F. and Moretta, A. (2012). Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*, 119(2), 399-410.
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N. and Raulet, D. H. (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol*, 1(2), 119-126.
- Dokun, A. O., Kim, S., Smith, H. R., Kang, H. S., Chu, D. T. and Yokoyama, W. M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol*, 2(10), 951-956.
- Dobrovina, E. S., Dobrovin, M. M., Vider, E., Sisson, R. B., O'Reilly, R. J., Dupont, B. and Vyas, Y. M. (2003). Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol*, 171(12), 6891-6899.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516.

- Eswaran, J., Sinclair, P., Heidenreich, O., Irving, J., Russell, L. J., Hall, A., Calado, D. P., Harrison, C. J. and Vormoor, J. (2015). The pre-B-cell receptor checkpoint in acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*, 29(8), 1623-1631.
- Falschlehner, C., Emmerich, C. H., Gerlach, B. and Walczak, H. (2007). TRAIL signalling: decisions between life and death. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(7-8), 1462-1475.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Verges, S., Lanier, L. L., Weisdorf, D. and Miller, J. S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*, 119(11), 2665-2674.
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J. and Raulet, D. H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*, 436(7054), 1186-1190.
- Gately, M. K., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M. and Chizzonite, R. (1992). Regulation of human cytolytic lymphocyte responses by interleukin-12. *Cell Immunol*, 143(1), 127-142.
- Geginat, J., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2003). Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 101(11), 4260-4266.
- Geluk, A., van Meijgaarden, K. E. and Ottenhoff, T. H. (1997). Flexibility in T-cell receptor ligand repertoires depends on MHC and T-cell receptor clonotype. *Immunology*, 90(3), 370-375.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G. and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med*, 195(3), 327-333.
- Gershon, R. K. and Kondo, K. (1971). Infectious immunological tolerance. *Immunology*, 21(6), 903-914.
- Ghazavi, F., Lammens, T., Van Roy, N., Poppe, B., Speleman, F., Benoit, Y., Van Vlierberghe, P. and De Moerloose, B. (2015). Molecular basis and clinical significance of genetic aberrations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol*, 43(8), 640-653.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J. Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchenker, W., Martin, F. and Zitvogel, L. (2005). CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med*, 202(8), 1075-1085.

- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N. and Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, 104(12), 3664-3671.
- Hall, B. M. (2015). T Cells: Soldiers and Spies--The Surveillance and Control of Effector T Cells by Regulatory T Cells. *Clin J Am Soc Nephrol*, 10(11), 2050-2064.
- Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*, 351(26), 2715-2729.
- Hammarlund, E., Lewis, M. W., Hansen, S. G., Strelow, L. I., Nelson, J. A., Sexton, G. J., Hanifin, J. M. and Slifka, M. K. (2003). Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. *Nat Med*, 9(9), 1131-1137.
- Harrington, L. E., Mangan, P. R. and Weaver, C. T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr Opin Immunol*, 18(3), 349-356.
- Harrison, C. J. (2009). Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 144(2), 147-156.
- Hayakawa, Y., Screpanti, V., Yagita, H., Grandien, A., Ljunggren, H. G., Smyth, M. J. and Chambers, B. J. (2004). NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol*, 172(1), 123-129.
- Henson, S. M. and Akbar, A. N. (2009). KLRG1--more than a marker for T cell senescence. *Age (Dordr)*, 31(4), 285-291.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E. and Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, 16(2), 216-229.
- Hirahara, K., Ghoreschi, K., Laurence, A., Yang, X. P., Kanno, Y. and O'Shea, J. J. (2010). Signal transduction pathways and transcriptional regulation in Th17 cell differentiation. *Cytokine Growth Factor Rev*, 21(6), 425-434.
- Hirahara, K. and Nakayama, T. (2016). CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol*, 28(4), 163-171.
- Hornig, T., Bezbradica, J. S. and Medzhitov, R. (2007). NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat Immunol*, 8(12), 1345-1352.
- Hunger, S. P. and Mullighan, C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373(16), 1541-1552.

- Huntington, N. D., Puthalakath, H., Gunn, P., Naik, E., Michalak, E. M., Smyth, M. J., Tabarias, H., Degli-Esposti, M. A., Dewson, G., Willis, S. N., Motoyama, N., Huang, D. C., Nutt, S. L., Tarlinton, D. M. and Strasser, A. (2007). Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. *Nat Immunol*, 8(8), 856-863.
- Ivanov, I. I., McKenzie, B. S., Zhou, L., Tadokoro, C. E., Lepelley, A., Lafaille, J. J., Cua, D. J. and Littman, D. R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells. *Cell*, 126(6), 1121-1133.
- Ivanova, E. A. and Orekhov, A. N. (2015). T Helper Lymphocyte Subsets and Plasticity in Autoimmunity and Cancer: An Overview. *Biomed Res Int*, 2015, 327470.
- Johnstone, R. W., Frew, A. J. and Smyth, M. J. (2008). The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy. *Nat Rev Cancer*, 8(10), 782-798.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M. and Hengartner, H. (1996). Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity and their role in immunological protection and pathogenesis in vivo. *Annu Rev Immunol*, 14, 207-232.
- Kaplan, M. H., Sun, Y. L., Hoey, T. and Grusby, M. J. (1996). Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature*, 382(6587), 174-177.
- Karre, K. (1997). How to recognize a foreign submarine. *Immunol Rev*, 155, 5-9.
- Kato, M. and Manabe, A. (2018). Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Int*, 60(1), 4-12.
- Keppel, M. P., Yang, L. and Cooper, M. A. (2013). Murine NK cell intrinsic cytokine-induced memory-like responses are maintained following homeostatic proliferation. *J Immunol*, 190(9), 4754-4762.
- Kiessling, R., Klein, E. and 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. *Eur J Immunol*, 5(2), 112-117.
- Klonowski, K. D. and Lefrancois, L. (2005). The CD8 memory T cell subsystem: integration of homeostatic signaling during migration. *Semin Immunol*, 17(3), 219-229.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M. and Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol*, 27, 485-517.
- Krebs, P., Barnes, M. J., Lampe, K., Whitley, K., Bahjat, K. S., Beutler, B., Janssen, E. and Hoebe, K. (2009). NK-cell-mediated killing of target cells

- triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood*, 113(26), 6593-6602.
- Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S. and Vivier, E. (2014). Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol*, 92(3), 221-229.
- Lanier, L. L. (2003). Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol*, 15(3), 308-314.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 225-274.
- Lanier, L. L., Corliss, B., Wu, J. and Phillips, J. H. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity*, 8(6), 693-701.
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. and Phillips, J. H. (1986). The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol*, 136(12), 4480-4486.
- Laouar, Y., Sutterwala, F. S., Gorelik, L. and Flavell, R. A. (2005). Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nature Immunology*, 6(6), 600-607.
- Lauvau, G. and Soudja, S. M. (2015). Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity. *Adv Exp Med Biol*, 850, 73-80.
- Lee, S. H., Kim, K. S., Fodil-Cornu, N., Vidal, S. M. and Biron, C. A. (2009). Activating receptors promote NK cell expansion for maintenance, IL-10 production, and CD8 T cell regulation during viral infection. *J Exp Med*, 206(10), 2235-2251.
- Leong, J. W., Chase, J. M., Romee, R., Schneider, S. E., Sullivan, R. P., Cooper, M. A. and Fehniger, T. A. (2014). Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20(4), 463-473.
- Loh, E. Y., Lanier, L. L., Turck, C. W., Littman, D. R., Davis, M. M., Chien, Y. H. and Weiss, A. (1987). Identification and sequence of a fourth human T cell antigen receptor chain. *Nature*, 330(6148), 569-572.
- Long, E. O., Barber, D. F., Burshtyn, D. N., Faure, M., Peterson, M., Rajagopalan, S., Renard, V., Sandusky, M., Stebbins, C. C., Wagtmann, N. and Watzl, C. (2001). Inhibition of natural killer cell activation signals by killer cell immunoglobulin-like receptors (CD158). *Immunol Rev*, 181, 223-233.
- Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., Houchins, J. P., Miller, S., Kang, S. M., Norris, P. J., Nixon, D. F. and Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer

- cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(36), 14725-14732.
- Lu, L., Ikizawa, K., Hu, D., Werneck, M. B., Wucherpfennig, K. W. and Cantor, H. (2007). Regulation of activated CD4<sup>+</sup> T cells by NK cells via the Qa-1-NKG2A inhibitory pathway. *Immunity*, 26(5), 593-604.
- Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. and Xia, B. (2012). CD4(+)T cells: differentiation and functions. *Clin Dev Immunol*, 2012, 925135.
- Luetke-Eversloh, M., Hammer, Q., Durek, P., Nordstrom, K., Gasparoni, G., Pink, M., Hamann, A., Walter, J., Chang, H. D., Dong, J. and Romagnani, C. (2014). Human cytomegalovirus drives epigenetic imprinting of the IFNG locus in NKG2Chi natural killer cells. *PLoS Pathog*, 10(10), e1004441.
- Ma, A., Koka, R. and Burkett, P. (2006). Diverse functions of IL-2, IL-15, and IL-7 in lymphoid homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 24, 657-679.
- Mahnke, Y. D., Brodie, T. M., Sallusto, F., Roederer, M. and Lugli, E. (2013). The who's who of T-cell differentiation: Human memory T-cell subsets. *European Journal of Immunology*, 43(11), 2797-2809.
- Majewska-Szczepanik, M., Paust, S., von Andrian, U. H., Askenase, P. W. and Szczepanik, M. (2013). Natural killer cell-mediated contact sensitivity develops rapidly and depends on interferon-alpha, interferon-gamma and interleukin-12. *Immunology*, 140(1), 98-110.
- Malnati, M. S., Peruzzi, M., Parker, K. C., Biddison, W. E., Ciccone, E., Moretta, A. and Long, E. O. (1995). Peptide specificity in the recognition of MHC class I by natural killer cell clones. *Science*, 267(5200), 1016-1018.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*, 5(12), 1260-1265.
- Mescher, M. F., Curtsinger, J. M., Agarwal, P., Casey, K. A., Gerner, M., Hammerbeck, C. D., Popescu, F. and Xiao, Z. (2006). Signals required for programming effector and memory development by CD8<sup>+</sup> T cells. *Immunol Rev*, 211, 81-92.
- Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L. L., Karre, K. and Soderstrom, K. (2002). A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition. *J Exp Med*, 196(11), 1403-1414.
- Min-Oo, G., Kamimura, Y., Hendricks, D. W., Nabekura, T. and Lanier, L. L. (2013). Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol*, 34(6), 251-258.

- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D. and Kaveri, S. V. (2004). Cutting edge: human CD4+CD25+ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*, 172(8), 4676-4680.
- Mocikat, R., Braumuller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmuller, G., Koszinowski, U. and Rocken, M. (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity*, 19(4), 561-569.
- Moorman, A. V. (2012). The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev*, 26(3), 123-135.
- Morandi, B., Bougras, G., Muller, W. A., Ferlazzo, G. and Munz, C. (2006). NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol*, 36(9), 2394-2400.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136(7), 2348-2357.
- Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*, 7, 145-173.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. and Janeway, C. (2012). *Janeway's immunobiology* (Vol. 8th Edition): Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Nagata, S. and Golstein, P. (1995). The Fas death factor. *Science*, 267(5203), 1449-1456.
- Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N. and Cerwenka, A. (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med*, 209(13), 2351-2365.
- North, J., Bakhsh, I., Marden, C., Pittman, H., Addison, E., Navarrete, C., Anderson, R. and Lowdell, M. W. (2007). Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol*, 178(1), 85-94.
- O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L. and von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*, 7(5), 507-516.
- Olson, J. A., Leveson-Gower, D. B., Beilhack, A. and Negrin, R. S. (2007). NK cells induce alloreactive donor T cell apoptosis and decrease proliferation in GVHD induction. *Blood*, 110(11), 643a-643a.

- Pal, M., Schwab, L., Yermakova, A., Mace, E. M., Claus, R., Krahl, A.-C., Woiterski, J., Hartwig, U. F., Orange, J. S., Handgretinger, R. and André, M. C. (2017). Tumor-priming converts NK cells to memory-like NK cells. *Oncol Immunology*, 6(6), e1317411.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 201-214.
- Paust, S., Gill, H. S., Wang, B. Z., Flynn, M. P., Moseman, E. A., Senman, B., Szczepanik, M., Telenti, A., Askenase, P. W., Compans, R. W. and von Andrian, U. H. (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol*, 11(12), 1127-1135.
- Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A. and Sher, A. (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J Exp Med*, 173(1), 159-166.
- Pedroza-Pacheco, I., Madrigal, A. and Saudemont, A. (2013). Interaction between natural killer cells and regulatory T cells: perspectives for immunotherapy. *Cell Mol Immunol*, 10(3), 222-229.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M. and Engert, A. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, 27(6), 965-974.
- Pui, C. H., Mullighan, C. G., Evans, W. E. and Relling, M. V. (2012). Pediatric acute lymphoblastic leukemia: where are we going and how do we get there? *Blood*, 120(6), 1165-1174.
- Rabinovich, B. A., Li, J., Shannon, J., Hurren, R., Chalupny, J., Cosman, D. and Miller, R. G. (2003). Activated, but not resting, T cells can be recognized and killed by syngeneic NK cells. *Journal of Immunology*, 170(7), 3572-3576.
- Rahbari, M. and Mason, A. L. (2015). Importance of MHC Class-I bound Peptide in the Regulation of KIR Mediated Inhibition of Natural Killer Cells. *Archives of Medicine*, 7(3), 11.
- Raulet, D. H. (2003). Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol*, 3(10), 781-790.
- Raulet, D. H., Vance, R. E. and McMahon, C. W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*, 19, 291-330.

- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tsiopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R. and Kay, A. B. (1992). Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med*, 326(5), 298-304.
- Rolle, A., Pollmann, J., Ewen, E. M., Le, V. T., Halenius, A., Hengel, H. and Cerwenka, A. (2014). IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest*, 124(12), 5305-5316.
- Romagnani, S. (1999). Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis*, 5(4), 285-294.
- Romee, R., Rosario, M., Berrien-Elliott, M. M., Wagner, J. A., Jewell, B. A., Schappe, T., Leong, J. W., Abdel-Latif, S., Schneider, S. E., Willey, S., Neal, C. C., Yu, L., Oh, S. T., Lee, Y. S., Mulder, A., Claas, F., Cooper, M. A. and Fehniger, T. A. (2016). Cytokine-induced memory-like natural killer cells exhibit enhanced responses against myeloid leukemia. *Sci Transl Med*, 8(357), 357ra123.
- Romee, R., Schneider, S. E., Leong, J. W., Chase, J. M., Keppel, C. R., Sullivan, R. P., Cooper, M. A. and Fehniger, T. A. (2012). Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*, 120(24), 4751-4760.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M. Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L. A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K. S., Braiman, A. and Porgador, A. (2011). Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *J Immunol*, 187(11), 5693-5702.
- Rouce, R. H., Shaim, H., Sekine, T., Weber, G., Ballard, B., Ku, S., Barese, C., Murali, V., Wu, M. F., Liu, H., Shpall, E. J., Bollard, C. M., Rabin, K. R. and Rezvani, K. (2016). The TGF-beta/SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B-acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*, 30(4), 800-811.
- Ruggeri, L., Parisi, S., Urbani, E. and Curti, A. (2015). Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front Immunol*, 6, 479.
- Sakaguchi, S. (2005). Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 6(4), 345-352.
- Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H. G. and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, 102(4), 1389-1396.
- Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*, 22, 745-763.

- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 401(6754), 708-712.
- Sanchez-Correa, B., Morgado, S., Gayoso, I., Bergua, J. M., Casado, J. G., Arcos, M. J., Bengochea, M. L., Duran, E., Solana, R. and Tarazona, R. (2011). Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother*, 60(8), 1195-1205.
- Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., Han, H., Chiang, S. C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K. J., Ljunggren, H. G., Miller, J. S. and Bryceson, Y. T. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 42(3), 443-456.
- Schrapppe, M., Möricke, A., Attarbaschi, A. and von Stackelberg, A. (2018). Akute lymphatische Leukämie *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie* (Vol. 2. Auflage, pp. 269): Springer, Berlin, Heidelberg.
- Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M. and Rose, J. K. (1989). The lck tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell*, 59(4), 627-636.
- Shimoda, K., van Deursen, J., Sangster, M. Y., Sarawar, S. R., Carson, R. T., Tripp, R. A., Chu, C., Quelle, F. W., Nosaka, T., Vignali, D. A., Doherty, P. C., Grosveld, G., Paul, W. E. and Ihle, J. N. (1996). Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature*, 380(6575), 630-633.
- Smith, C. A., Williams, G. T., Kingston, R., Jenkinson, E. J. and Owen, J. J. (1989). Antibodies to CD3/T-cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, 337(6203), 181-184.
- Smith, H. R., Heusel, J. W., Mehta, I. K., Kim, S., Dorner, B. G., Naidenko, O. V., Iizuka, K., Furukawa, H., Beckman, D. L., Pingel, J. T., Scalzo, A. A., Fremont, D. H. and Yokoyama, W. M. (2002). Recognition of a virus-encoded ligand by a natural killer cell activation receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(13), 8826-8831.
- Snanoudj, R., Frangie, C., Deroure, B., Francois, H., Creput, C., Beaudreuil, S., Durrbach, A. and Charpentier, B. (2007). The blockade of T-cell co-stimulation as a therapeutic stratagem for immunosuppression: Focus on belatacept. *Biologics*, 1(3), 203-213.
- Soderquest, K., Walzer, T., Zafirova, B., Klavinskis, L. S., Polic, B., Vivier, E., Lord, G. M. and Martin-Fontecha, A. (2011). Cutting edge: CD8+ T cell priming in the absence of NK cells leads to enhanced memory responses. *J Immunol*, 186(6), 3304-3308.

- Spits, H., Bernink, J. H. and Lanier, L. (2016). NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. *Nat Immunol*, 17(7), 758-764.
- Sprent, J. and Surh, C. D. (2002). T cell memory. *Annu Rev Immunol*, 20, 551-579.
- Storkus, W. J., Salter, R. D., Alexander, J., Ward, F. E., Ruiz, R. E., Cresswell, P. and Dawson, J. R. (1991). Class I-induced resistance to natural killing: identification of nonpermissive residues in HLA-A2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(14), 5989-5992.
- Street, S. E., Cretney, E. and Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*, 97(1), 192-197.
- Stringaris, K., Sekine, T., Khoder, A., Alsuliman, A., Razzaghi, B., Sargeant, R., Pavlu, J., Brisley, G., de Lavallade, H., Sarvaria, A., Marin, D., Mielke, S., Apperley, J. F., Shpall, E. J., Barrett, A. J. and Rezvani, K. (2014). Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 99(5), 836-847.
- Sun, J. C., Beilke, J. N. and Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 457(7229), 557-561.
- Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L. and Lanier, L. L. (2011). NK cells and immune "memory". *J Immunol*, 186(4), 1891-1897.
- Sun, J. C., Madera, S., Bezman, N. A., Beilke, J. N., Kaplan, M. H. and Lanier, L. L. (2012). Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *J Exp Med*, 209(5), 947-954.
- Surh, C. D. and Sprent, J. (2005). Regulation of mature T cell homeostasis. *Semin Immunol*, 17(3), 183-191.
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M. and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*, 168(2), 671-679.
- Tau, G. and Rothman, P. (1999). Biologic functions of the IFN-gamma receptors. *Allergy*, 54(12), 1233-1251.
- Terry, L. A., Brown, M. H. and Beverley, P. C. (1988). The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180,000 MW component of the human leucocyte-common antigen, CD45. *Immunology*, 64(2), 331-336.
- Trinchieri, G., Pflanz, S. and Kastelein, R. A. (2003). The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19(5), 641-644.

- Trivedi, P. P., Roberts, P. C., Wolf, N. A. and Swanborg, R. H. (2005). NK cells inhibit T cell proliferation via p21-mediated cell cycle arrest. *J Immunol*, 174(8), 4590-4597.
- van Kooten, C. and Banchereau, J. (1997). Functions of CD40 on B cells, dendritic cells and other cells. *Curr Opin Immunol*, 9(3), 330-337.
- Veillette, A., Zuniga-Pflucker, J. C., Bolen, J. B. and Kruisbeek, A. M. (1989). Engagement of CD4 and CD8 expressed on immature thymocytes induces activation of intracellular tyrosine phosphorylation pathways. *J Exp Med*, 170(5), 1671-1680.
- Verneris, M. R. (2013). Natural killer cells and regulatory T cells: how to manipulate a graft for optimal GVL. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2013, 335-341.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L. and Moretta, A. (1998). NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*, 187(12), 2065-2072.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. and Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9(5), 503-510.
- Walzer, T., Blery, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S., Andre, P., Gauthier, L., Daniel, L., Chemin, K., Morel, Y., Dalod, M., Imbert, J., Pierres, M., Moretta, A., Romagne, F. and Vivier, E. (2007). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(9), 3384-3389.
- Watzl, C. (2014). How to trigger a killer: modulation of natural killer cell reactivity on many levels. *Adv Immunol*, 124, 137-170.
- Watzl, C., Urlaub, D., Fasbender, F. and Claus, M. (2014). Natural killer cell regulation - beyond the receptors. *F1000Prime Rep*, 6, 87.
- Weaver, C. T., Harrington, L. E., Mangan, P. R., Gavrieli, M. and Murphy, K. M. (2006). Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*, 24(6), 677-688.
- Wensveen, F. M., Lenartic, M., Jelencic, V., Lemmermann, N. A., ten Brinke, A., Jonjic, S. and Polic, B. (2013). NKG2D induces Mcl-1 expression and mediates survival of CD8 memory T cell precursors via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Immunol*, 191(3), 1307-1315.

- Westermann, J. and Pabst, R. (1992). Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Invest*, 70(7), 539-544.
- Williams, M. A. and Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*, 25, 171-192.
- Wu, J. D., Higgins, L. M., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K. and Plymate, S. R. (2004). Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J Clin Invest*, 114(4), 560-568.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S. and Perussia, B. (1998). Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*, 188(12), 2375-2380.
- Zediak, V. P., Wherry, E. J. and Berger, S. L. (2011). The contribution of epigenetic memory to immunologic memory. *Curr Opin Genet Dev*, 21(2), 154-159.
- Zhu, J. and Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood*, 112(5), 1557-1569.
- Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. and Paul, W. E. (2006). GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res*, 16(1), 3-10.
- Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B. G., Tanaka, Y., Santoni, A. and Lanier, L. L. (2004). Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol*, 173(6), 3716-3724.

## II. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>Antibody-dependent cellular cytotoxicity</i>
AF647/AF700	Alexa Fluor 647/700
AICD	<i>Activation induced cell death</i>
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin oder Antigenpräsentierende Zelle
ARD	Amine reactive dye
BCP-ALL	Akute B-Zell Vorläufer Leukämie
BUV395	Brilliant Ultraviolet 395
BV421/BV711	Brilliant violet 421/711
CCR	Chemokin Rezeptor
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxylfluorescein succinimidyl ester
CHS	Kontakt-Hypersensibilität
CIML-NK Zellen	Cytokin-induzierte Memory-like NK Zellen
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Cytotoxischer T Lymphozyt
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
DC	Dendritische Zelle
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>
DMSO	Dimethylsulfid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	<i>DNAX Accessory Molecule-1</i>
E:T	Effektor : Target Verhältnis
EDTA	Di-Natriummethylen-diamintetraacetat
FA	Formaldehyd

---

FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FC	<i>Fragment crystallizable</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	<i>Fluorescence minus one</i>
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
FSC	Vorwärts-Streulicht ( <i>Forward scatter</i> )
<i>g</i>	Gravitationsfeldstärke oder Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	<i>Graft versus host disease</i>
GvL	<i>Graft versus leukemia</i>
Gy	Grey
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HuS	Humanserum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphocyte cell</i>
ITAM	Immunoreceptor tyrosin-based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif
KIRs	<i>Killer-cell immunoglobulin (Ig)-like receptors</i>
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
MCMV	Murines Cytomegalievirus
MHC	Major histocompatibility complex

MIC-A/B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>
NCR	Natürliche Cytotoxizitätsrezeptoren
NKG2A/NKG2C/NKG2D	Natural killer group 2 member A/C/D
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphategepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PE CF594	<i>Phycoerythrin-cyanine based deep-red fluorescent dye 594</i>
PE-Cy7	<i>Phycoerythrin cyanine 7</i>
PerCP	Peridinin-chlorophyll
PLZF	<i>Promyelocytic leukemia zinc finger protein</i>
PVR	Polio-Virus Rezeptor
Rag	<i>Recombination activating gene</i>
ROR $\gamma$ t	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (Medium)</i>
RT	Raumtemperatur
SNK	Spender Natürlicher Killerzellen
SSC	Seitwärts-Streulicht ( <i>side scatter</i> )
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
T-bet	<i>T-box expressed in T cells</i>
TCM	<i>central memory T cells</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TEM	<i>Effector memory T cells</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th	T Helferzelle
TIML-NK Zellen	Tumor-induzierte Memory-like NK Zellen
TN	<i>naïve T cells</i>
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>

Tregs	regulatorische T Zellen
TTE	<i>terminal effector T cells</i>
TTM	<i>transitional memory T cells</i>
U	Units
ULBPs	UL16-Bindeproteine
VLP	<i>Virus-like particles</i>

### III. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Schematische Darstellung der NK Zellerkennung und deren Folgen. ....	9
Abbildung 2 Schematische Übersicht der wichtigsten NK Zellrezeptoren sowie deren Liganden. ....	11
Abbildung 3 Übersicht Kulturmodell zur Generierung von Memory-like NK Zellen. ....	35
Abbildung 4 Übersicht Kulturmodell zur Kokultivierung von NK und PBMCs.....	40
Abbildung 5 Tumorpriming von NK Zellen führt zur Konvertierung in TIML-NK Zellen und damit zu einer gesteigerten Funktionalität. ....	50
Abbildung 6 Tumorpriming von NK Zellen führt zu tumorpspezifischen TIML-NK Zellen. .	51
Abbildung 7 TIML- und CIML-NK Zellen induzieren schneller Apoptose bei Tumorzellen als naive NK Zellen.....	53
Abbildung 8 Oberflächencharakterisierung von verwendeten Tumorzellen hinsichtlich ihrer NK-Zellliganden. ....	54
Abbildung 9 Analyse des Milieus von Cytokinen und cytotoxischen Markern bei der Konvertierung in TIML- und CIML-NK Zellen an Tag 7 der Kultur.....	55
Abbildung 10 Tumorpriming von TIML-NK Zellen ist Zellkontakt-abhängig. ....	57
Abbildung 11 Zellfragmente induzieren ebenfalls TIML-NK Zellen. ....	58
Abbildung 12 Die Konvertierung in TIML-NK Zellen erfolgt unabhängig von der NKG2D- Achse.....	60
Abbildung 13 Phänotypische Untersuchung naiver und TIML-NK Zellen an Tag 7. ....	61
Abbildung 14 Proliferation an Tag 3 der CD4+ und CD8+ T Zellen nach Kokultur mit NK Zellen. ....	63
Abbildung 15 Proliferation der CD4+ Tregs an Tag 3 nach Kokultur mit NK Zellen.....	64
Abbildung 16 Exemplarische Darstellung der durchflusszytometrischen Gating-Strategie zur Identifizierung humaner CD8+ Memory Subpopulationen (angelehnt an Mahnke et al, 2013.).....	65
Abbildung 17 Proliferation der CD8+ T Zell Memory-Subpopulationen an Tag 3 nach Kokultur mit NK Zellen. ....	67

## IV. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht adaptiver Immuneigenschaften von NK Zellen.....	14
Tabelle 2 Übersicht möglicher Interaktion von NK und T Zellen. ....	21
Tabelle 3 Geräte sowie deren Hersteller.....	25
Tabelle 4 Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.....	26
Tabelle 5 Software sowie verwendete Version und Hersteller.....	26
Tabelle 6 Reagenzien sowie deren Bezug.....	26
Tabelle 7 Medien und Puffer sowie deren Zusammensetzung.....	27
Tabelle 8 Zelllinien/primäre Leukämien mit Eigenschaften und deren Bezug.....	28
Tabelle 9 Farbstoffe sowie deren Bezug.....	28
Tabelle 10 Antikörper mit Isotyp sowie deren gekoppeltes Fluorochrom, Verdünnung, Klon und Bezug.....	28
Tabelle 11 Interleukine sowie deren Bezug.....	30
Tabelle 12 Verwendete Kits mit Eigenschaft sowie deren Bezug.....	31

## V. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Lisa Schwab, dass ich die zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung von Tumor-induzierten Memory-like NK Zellen“ selbstständig verfasst und nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche gekennzeichnet habe. Ich erkläre, dass die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis der Universität Tübingen (Beschluss des Senats vom 25. Mai 2000) beachtet wurden.

Echterdingen, 10.01.2019

Lisa Schwab

## VI. Beteiligung

Die Daten der vorliegenden Dissertation entstammen bis auf folgende Ausnahmen meiner alleinigen experimentellen Arbeit:

Frau Vanessa Borgmann führte im Rahmen ihrer Masterarbeit im Fach Biologie unter meiner inhaltlichen und experimentellen Anleitung Untersuchungen zum Priming naiver NK Zellen mit AML und ALL Patientenproben durch. Zudem analysierte sie die Beteiligung der NKG2D/IL15 Achse sowie die Zusammensetzung des Cytokinmilieus bei der Konvertierung von naiven in TIML-NK Zellen.

Herr Christoph Riedmüller half im Rahmen seiner Masterarbeit im Fach Biologie unter meiner inhaltlichen und experimentellen Anleitung bei der Etablierung des Kokultursystems aus NK Zellen und autologen PBMCs. Er untersuchte die Proliferationsraten der T Zellen nach Kokultur mit naiven und TIML-NK Zellen.

Als technische Assistentin führte Frau Sarah Bühler einen Teil der *in vitro* Experimente unter meiner inhaltlichen Anleitung durch.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von Frau PD Dr. Dr. Maya C. André und Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee durchgeführt.

## VII. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### Publikation

Pal, M., Schwab, L., Yermakova, A., Mace, E. M., Claus, R., Krahl, A.-C., Woiterski, J., Hartwig, U. F., Orange, J. S., Handgretinger, R. and André, M. C. (2017). Tumor-priming converts NK cells to memory-like NK cells. *OncolImmunology*, 6(6), e1317411.

### Posterpräsentationen

Marina Pal, Lisa Schwab, Rainer Claus, Emily Mace, Jordan S. Orange, Ann-Christin Krahl, Rupert Handgretinger, Maya C. André. *Tumor-priming generates „Memory-like“ NK cells.*

Forschungskolloquium 2017 der Medizinischen Fakultät des Universitätsklinikums Tübingen

Tübingen, 13.01.2017

Lisa Schwab, Marina Pal, Vanessa Borgmann, Maya C. André. *The conversion from effector NK cells to Tumor-induced memory-like NK cells.*

Novel Concepts in Innate Immunity

Tübingen, 27.- 29.03.2017

Lisa Schwab, Marina Pal, Vanessa Borgmann, Maya C. André. *The conversion from effector NK cells to Tumor-induced memory-like NK cells.*

Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI 2017)

Erlangen, 12.-15.09.2017

## VIII. Danksagung

Als erstes möchte ich PD Dr. Dr. Maya C. André für die Möglichkeit zur Anfertigung meiner Doktorarbeit in ihrer Arbeitsgruppe danken. Sie stand mir bei allen wissenschaftlichen Fragestellungen und Problemen zur Seite und trug mit zahlreichen Diskussionen maßgeblich zu dem Erfolg dieser Arbeit bei. Durch ihr ständiges konstruktives Feedback konnte ich in meiner Zeit als Doktorandin viel von ihr lernen. Vielen Dank dafür, Maya!

Des Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee, der bereitwillig die 2. Berichterstattung übernahm.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger bedanken, der mir den Arbeitsplatz in einem vollausgestatteten Labor überließ und so die Doktorarbeit an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin ermöglichte.

Ein ganz großes Dankeschön gilt außerdem der Jürgen-Manchot Stiftung, die mich finanziell im Rahmen eines Doktoranden-Stipendiums förderte. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Frau Elvira Thormann für die stets freundlichen und informativen Telefonate danken. Ohne diese Förderung wäre die Anfertigung meiner Arbeit nicht möglich gewesen!

Auch möchte ich mich bei allen Kindern bedanken, die zum Zeitpunkt ihrer Leukämie-Diagnose bereit waren, ihre Zellen der Forschung in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin zur Verfügung zu stellen.

Ebenso gilt mein Dank allen Freiwilligen zur Blutspende-Bereitschaft, welche für eine NK Zellisolation aus peripherem Blut unumgänglich ist.

Allen Mitarbeitern der Ebene 2, Studenten und Praktikanten möchte ich außerdem für die stets hilfsbereite und freundliche Atmosphäre danken. Auch möchte ich mich bei Katharina Reinhardt-Heller, Karo Cabanillas-Stanchi, Insa Hirschberg, Jennifer Rottenberger, Darina Siegmund, Caroline Baden, Ann-Christin Krahl, Andrés Lamsfus-Calle und Alberto Daniel-Moreno für die gute Aufnahme im Team und die super Zusammenarbeit unter teilweise sehr beengten Bedingungen bedanken. Mit euch ließ sich immer einer Lösung finden und lange Labortage wurden erträglicher. Ein besonderer Dank gilt hierbei Franziska Wiese, die mich nicht nur fachlich, sondern auch privat, unterstützte und begleitete. Vielen Dank für die schöne Zeit auf den Kongressen, im Labor und auch in unserer Freizeit. Ich hoffe wir verlieren uns nicht aus den Augen!

Auch möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe André bedanken. Ayline Kübler, Karla Baltner, Franziska Ginsberg und Henning Peters: vielen Dank für eure Hilfe und Diskussionsbereitschaft! Des Weiteren möchte ich mich bei Marina Schmidt für die hervorragende Einarbeitung und Zusammenarbeit bedanken. Außerdem gilt ein besonderer Dank Sarah Bühler, die mich mit ihrem methodischen Wissen ausgezeichnet im Labor unterstützte. Vielen Dank euch allen für die schöne kollegiale Zusammenarbeit!

Ein weiterer Dank gilt meinen Praktikanten und Masterstudenten Vanessa Borgmann, Christoph Riedmüller und Alexandros Nianias, welche ich während meiner Doktorarbeitszeit betreuen durfte. Ihr habt ebenfalls zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen!

Abschließend gilt mein besonderer Dank meiner Familie und Dominik, die stets Interesse an meiner Forschungsarbeit zeigten! Vielen Dank für eure Unterstützung und Motivation in dieser teils stressigen Zeit, ohne Euch wäre die Umsetzung so nicht möglich gewesen!