

**Untersuchungen zur Funktionalität  
humaner NK Zellen nach adoptivem Transfer in murine  
Xenotransplantationsmodelle**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von

Köthe, Dorothea

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. R. Handgretinger

2. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wehkamp

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Murines Xenotransplantationsmodell	1
1.1.1	Grundlagen	1
1.1.2	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> IL2rg <sup>tmWjl</sup> /Sz (NSG) Mausstamm	3
1.1.3	NOD.Cg-Rag1 <sup>tm1Mom</sup> IL2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ (NRG) und NRG-B27 Mausstamm	3
1.2	Natürliche Killer Zellen	4
1.2.1	Grundlagen	4
1.2.2	NK Zell-Phänotyp	5
1.2.3	NK Zell-Funktionalität	8
1.2.4	Rolle von NK Zellen in der Stammzelltransplantation	10
1.3	Bedeutung des Zytokin IL15 für die NK Zell-Ontogenese und - Funktionalität	12
1.4	Bedeutung der MHC-Klasse-1-Moleküle für die NK Zell-Ontogenese und - Funktionalität	14
1.5	Zielsetzung der Doktorarbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Materialien	18
2.1.1	Allgemeine Materialien	18
2.1.2	Material zur NK Zell-Gewinnung	19
2.1.3	Zytokine	19
2.1.4	Material für die Durchflusszytometrie	20
2.1.5	Humane NK Zellen	21
2.1.6	K562-Zelllinie	21
2.1.7	Versuchstiere	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Versuchsaufbau	22
2.2.2	Übersicht über die verwendeten Mäuse	24
2.2.3	Zellzahl-Bestimmung	24
2.2.5	Isolierung von PBMCs	25
2.2.6	Isolierung von NK Zellen mittels MACS	26
2.2.7	Tierexperimenteller Versuchsteil	27
2.2.8	Analyse mittels Durchflusszytometrie	28

---

2.2.9	<i>In vitro</i> Zytotoxizitätstest: NK Zell-Funktionalitätstest	32
2.2.10	Statistik	35
3	Ergebnisse	36
3.1	Hat die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls einen Effekt auf die NK Zell-Frequenzen nach adoptivem Transfer humaner NK Zellen in NRG bzw. NSG Mäuse?	36
3.2	Wie verhalten sich die Frequenzen der CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse?	41
3.3	Hat die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls einen Effekt auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse?	45
3.4	Welche Rolle spielt die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls für die Zytotoxizität von humanen NK Zellen nach AT in NRG Mäuse?	56
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Anhang	VII
8	Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	XV
9	Danksagung	XVI

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ausreißer
ADCC	engl. <i>antibody-dependent cellular cytotoxicity</i> , z. Dt. Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ARD	engl. <i>Amine reactive dye</i>
AT	Adoptiver Transfer
BCP-ALL	Akute B-Zell Vorläufer Leukämie
CD	engl. <i>Cluster of differentiation</i> , Differenzierungsmarker an der Oberfläche von Zellen
CFSE	<i>Carboxylfluorescein Succinimidyl Ester</i>
CML	Chronisch myeloische Leukämie
DC	Dendritische Zelle
Fc	engl. <i>fragment crystallisable</i>
GM-CSF	engl. <i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	engl. <i>Graft versus Host Disease</i>
GvL	engl. <i>Graft versus Leukemia</i>
HSC	engl. <i>hematopoietic stem cell</i> , z. Dt. hämatopoetische Stammzelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL2rg	Interleukin-2-Rezeptor- $\gamma$ -Kette
ITAM	engl. <i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i> , z. Dt. Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Aktivierungsmotiv
ITIM	engl. <i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i> , z. Dt. Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes Inhibierungsmotiv
KLAR	Killerzellen-Lektin-ähnlicher Rezeptor
KIR	Killerzellen-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor
KM	Knochenmark
LAMP-1	engl. <i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
MHC	engl. <i>Major histocompatibility complex</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.b.	nicht berechenbar
NCR	Natürlicher Zytotoxizitäts-Rezeptor

NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
NOD	engl. <i>non-obese diabetic</i>
Nr.	Nummer
NRG	NOD.Cg-Rag1 <sup>tm1Mom</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ
NRG-B27	NOD.Cg-Rag1 <sup>tm1Mom</sup> Il2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ-B27
NSG	NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> Il2rg <sup>tmWjl</sup> /Sz
p	Signifikanzniveau
PBMC	engl. <i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> , z. Dt. Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
Prkdc	engl. <i>protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide</i>
Rag	engl. <i>Recombination-activating gene</i>
SCID	engl. severe combined immunodeficiency
SD	engl. <i>standarddeviation</i> , z. Dt. Standardabweichung
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ULBP	engl. <i>UL16 binding protein</i>

# 1 Einleitung

In dieser Arbeit wurde der Phänotyp und die Funktionalität Natürlicher Killer (NK) Zellen vor und nach adoptivem Transfer (AT) in ein murines Xenotransplantationsmodell verglichen und untersucht, welche Rolle dabei Zytokine wie IL15 oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls spielen. In der Einleitung wird daher zunächst ein Überblick über folgende Fragestellungen gegeben: Was ist ein murines Xenotransplantationsmodell? Welche Anwendungsgebiete gibt es? Welche Eigenschaften haben die für diese Arbeit verwendeten NSG bzw. NRG und NRG-B27 Mäuse? Was sind NK Zellen? Welche Rolle spielen sie im menschlichen Immunsystem und welche Rolle haben sie in der Stammzelltransplantation? Und zuletzt: Inwieweit wirken MHC-Moleküle und Zytokine wie IL15 auf die Ontogenese und Funktionalität von NK Zellen? Auf Grundlage dieser theoretischen Kenntnisse wird am Ende des Kapitels die konkrete Zielsetzung dieser Dissertationsarbeit formuliert.

## 1.1 Murines Xenotransplantationsmodell

### 1.1.1 Grundlagen

In den letzten Jahrzehnten konnten entscheidende Fortschritte im Verständnis von biologischen Systemen und Prozessen wie der Hämatopoese, der angeborenen und erworbenen Immunität, von Infektionskrankheiten und der Tumorbilogie erzielt werden, nicht zuletzt dank *in vivo* Analysen in Xenotransplantationsmodellen (Shultz et al. 2007). Bereits seit den 1960er Jahren werden Mäuse für derartige Studien verwendet (Hudson et al. 1998). Um durch *in vivo* Studien im Tiermodell zuverlässige Aussagen über menschliche Zellprozesse treffen zu können, wurden seither sogenannte „humanisierte Mäuse“ etabliert (Shultz et al. 2007). Dabei handelt es sich um Mäuse, die durch genetische Modifikation humane Gene exprimieren oder bei denen Mutationen zu einer Immundefizienz führen, welche das Anwachsen transferierter humaner Zellen oder Gewebe ermöglicht (Shultz et al. 2007).

In Immundefizienz resultieren zum einen die Mutation einer Proteinkinase (Prkdc, *protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide*) in CB17 Mäusen, die durch fehlende Bildung reifer T- und B-Lymphozyten zu einem „schweren kombinierten Immundefekt“ (engl. *severe combined immunodeficiency* = SCID) führt (Bosma et al. 1983), zum anderen verursacht eine Mutation im *Recombination-activating gene 1* (Rag1) und Rag 2 T- und B-Zell-Defekte (Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992). Bei Mäusen mit Prkdc<sup>scid</sup>- oder Rag-Mutation konnten aber nur geringe Anwachsrate humaner Zellen beobachtet werden, vermutlich aufgrund der erhaltenen NK Zell-Funktionalität (Shultz et al. 2007; Lapidot et al. 1992; Greiner et al. 1998; Mombaerts et al. 1992; Shinkai et al. 1992).

Ein funktionelles Defizit von murinen NK Zellen (Kataoka et al. 1983; Serreze und Leiter 1988) und anderen Komponenten des angeborenen Immunsystems (Baxter und Cooke 1993) wurde in *non-obese diabetic* (NOD) Mäusen entdeckt. Durch Kombination dieses NOD-Hintergrundes mit der Scid-Mutation und daraus resultierenden Defekten des angeborenen und erworbenen Immunsystems konnte eine höhere Anzahl humaner Zellen nach adoptivem Transfer in NOD/LtSz-SCID Mäusen detektiert werden (Shultz et al. 1995).

Eine weitere wichtige Entdeckung stellt die Mutation im Gen der Interleukin-2-Rezeptor- $\gamma$ -Kette (IL2rg) dar, die zu Defekten in der Signaltransduktion von Interleukinen (IL) führt, da die  $\gamma$ -Kette eine essentielle Untereinheit der Rezeptoren für IL2, IL4, IL7, IL9 und IL15 ist (Sugamura et al. 1996). Dadurch ist die Entwicklung und Funktionalität der B- und T-Zellen eingeschränkt und die Entwicklung der NK Zellen komplett unterdrückt (Cao et al. 1995), sodass der Maus Mechanismen zur Abstoßung xenogener Zellen fehlen. Durch Kombination dieser IL2rg-Mutation mit den zuvor genannten Genmodifikationen konnten Mausstämmen etabliert werden, die bessere Anwachsrate nach adoptivem Transfer humaner Zellen zeigten (Ito et al. 2002). Beispielsweise konnte in NOD-SCID IL2 $\gamma$ <sup>null</sup> Mäusen eine gute Entwicklung und Differenzierung transferierter humaner hämatopoetischer Stammzellen beobachtet werden (Shultz et al. 2005).

Dank dieser genetischen Mutationen ist es möglich, humane Zellen und Gewebe in das Mausmodell zu transferieren und (Langzeit-)Untersuchungen zu Eigenschaften und Funktionen humaner Zellen durchzuführen (Shultz et al. 2007). Allerdings werden derartiger Versuche limitiert, da sich die murine von der humanen Umgebung unterscheidet. Daher gibt es weitere Bestrebungen, humane MHC-Moleküle (MHC von engl. *Major Histocompatibility Complex*) in den murinen Genotyp einzubringen, die wichtig für die antigenspezifische T-Zell-Antwort und die NK Zell-Entwicklung sind (Shultz et al. 2007). Außerdem werden Mäuse mit MHC-Klasse-1-Transgenen beispielsweise zur Untersuchung von MHC-assoziierten Autoimmunerkrankungen, wie den Spondyloarthritis, hinzugezogen (Faulkner et al. 1998).

### 1.1.2 NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tmWjl</sup>/Sz (NSG) Mausstamm

Bei dem sogenannten NSG Mausstamm wurde auf dem NOD-Hintergrund die Scid-Mutation und die Mutation in der IL2 $\gamma$ -Signal-Transduktionskette kombiniert (The Jackson Laboratory 2015). Daher können die NSG Mäuse keine eigenen reifen T-, B- und funktionsfähige NK Zellen bilden. Durch die ausgeprägten Defekte in der angeborenen und erworbenen Immunität können adoptiv transferierte Zellen gut anwachsen (Shultz et al. 2005).

### 1.1.3 NOD.Cg-Rag1<sup>tm1Mom</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NRG) und NRG-B27 Mausstamm

Bei dem mit dem NSG Mausstamm verwandten NRG Mausstamm wurde auf dem NOD-Hintergrund die Rag1-Mutation und die Mutation in der IL2 $\gamma$ -Signaltransduktionskette kombiniert (The Jackson Laboratory 2015). So sind die NRG Mäuse ebenso durch das Fehlen von murinen T-, B- und NK Zellen immundefizient (Shultz et al. 2007).

Der NRG-B27 Mausstamm ist durch ein zusätzliches Transgen für das menschliche MHC-B27-Molekül gekennzeichnet. Das zur MHC-Bw4-Familie gehörende MHC-B27-Gen (Bodmer et al. 1997) ist mit einem humanen  $\beta$ 2-Mikroglobulin verbunden (Colbert 2004), welches wichtig ist für die MHC-Klasse-1-Präsentation auf Zelloberflächen.

Damit spielt es eine wichtige Rolle für die NK Zell-„Selbst“-Erkennung (siehe 1.2.2 und 1.4).

## 1.2 Natürliche Killer Zellen

### 1.2.1 Grundlagen

Natürliche Killer (NK) Zellen sind große, granuläre Lymphozyten des angeborenen (unspezifischen) Immunsystems, da sie ohne vorherige Sensibilisierung an der primären Bekämpfung von Tumor- und virusinfizierten Zellen beteiligt sind (Kenneth Murphy 2012). Dabei haben sie eine wichtige Mediatorfunktion zum adaptiven, spezifischen Immunsystem (Moretta et al. 2008). Frei im Blut zirkulierend machen NK Zellen 10 bis 15 % der Lymphozyten aus, sind aber auch in Leber, Milz, Uterus, Lunge, Thymus, sekundär lymphatischen und Mucosa-assoziierten Geweben zu finden (Robertson und Ritz 1990).

Sie sind definiert als CD56 positive (Lanier et al. 1989) und CD3 negative (Lanier et al. 1986) Zellen. Außerdem werden NK Zellen mit zunehmender Reifung CD16 positiv (Lanier et al. 1986; Cooper et al. 2001a).

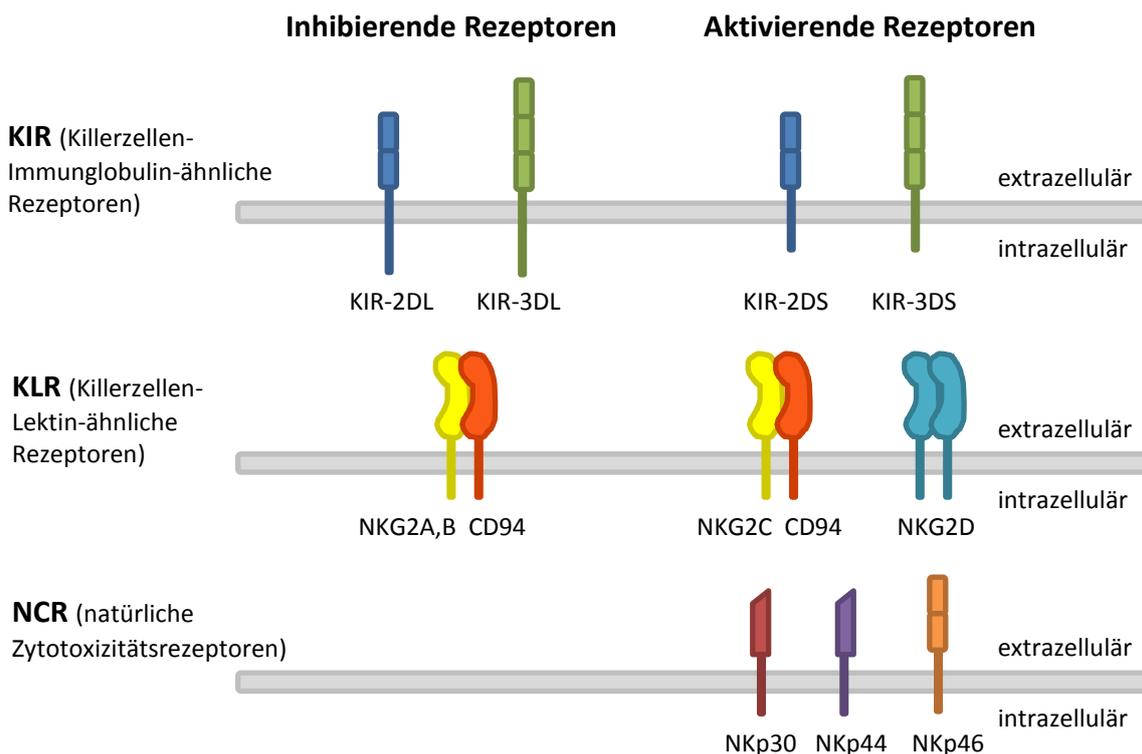
Gebildet werden NK Zellen wie alle Lymphozyten im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen (engl. *hematopoietic stem cell*, HSC) (Miller et al. 1992; Miller et al. 1994). In den letzten Entwicklungsstufen unterscheidet man zwischen CD56<sup>bright</sup>, den CD56<sup>high</sup> CD16<sup>-</sup> NK Zellen, und den sich daraus entwickelnden CD56<sup>dim</sup>, den CD56<sup>low</sup> CD16<sup>+</sup> NK Zellen (Freud und Caligiuri 2006; Lanier et al. 1986). CD56<sup>bright</sup> NK Zellen findet man v.a. in Lymphknoten (Fehniger et al. 2003), wo sie viele Zytokine, z.B. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ausschütten und nur eine geringe zytotoxische Aktivität aufweisen (Cooper et al. 2001b; Lanier et al. 1986; Fehniger et al. 1999). Im Blut liegen ungefähr 10 % der NK Zellen als CD56<sup>bright</sup> NK Zellen vor, die anderen 90 % bilden CD56<sup>dim</sup> NK Zellen (Lanier et al. 1986). Die CD56<sup>dim</sup> NK Zellen wandern während einer Entzündung, viraler Infektion oder bei Tumorwachstum schnell ins geschädigte Gewebe und schütten bei hoher zytotoxischer Aktivität weniger Zytokine aus (Lanier et al. 1986; Cooper et al. 2001a; Moretta 2002).

## 1.2.2 NK Zell-Phänotyp

Neben den eben genannten Oberflächenmarkern CD56 und CD16 wird der NK Zell-Phänotyp von sogenannten aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren gebildet, die die NK Zell-Aktivität regulieren (Yokoyama 1995; Yokoyama 1998; Lanier 2001).

### Unterteilung der Rezeptoren

Die Rezeptoren werden in Immunglobulin-ähnliche Proteine, dazu gehören die Killerzellen-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIR) und die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR), und C-Typ-Lektin-ähnliche Proteine, dazu gehören die Killerzellen-Lektin-ähnlichen Rezeptoren (KLR), unterteilt, wobei die KIR- und KLR-Familie jeweils aktivierende und inhibierende Rezeptoren enthält (Kenneth Murphy 2012; Cooper et al. 2001a). Ein Überblick ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1:** NK Zell-Rezeptoren werden nach ihrer Funktion in inhibierende und aktivierende Rezeptoren und nach ihrer Proteinfamilie in Immunglobulin-ähnliche (Killerzellen-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR) und natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR)) und C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren (Killerzellen-Lektin-ähnliche Rezeptoren (KLR)) unterteilt. (D. Köthe nach Abbildungen aus Kenneth Murphy 2012)

### **Inhibierende NK Zell-Rezeptoren und die *Missing-self*-Hypothese**

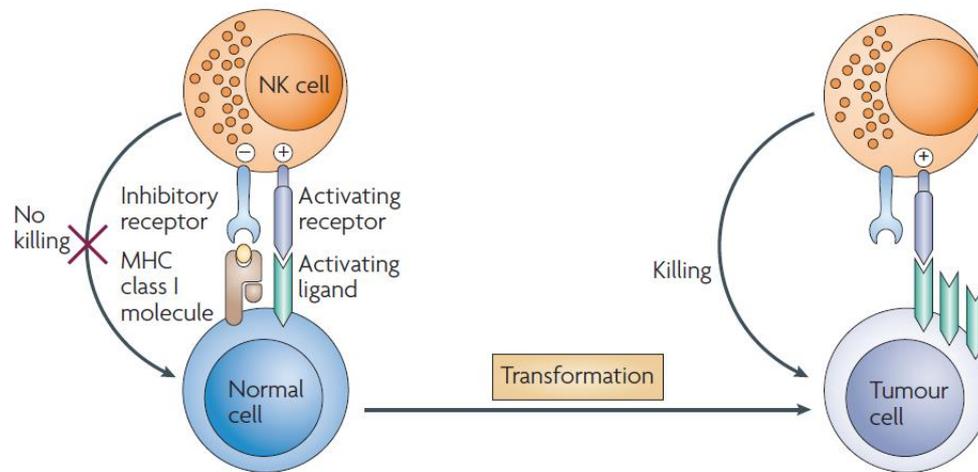
Zu den inhibierenden NK Zell-Rezeptoren gehören Rezeptoren der KIR-Familie und der NKG2A-Rezeptor. Beide erkennen MHC-Klasse-1-Moleküle, die von allen gesunden, körpereigenen, kernhaltigen Zellen exprimiert werden (Moretta et al. 1996). Die verschiedenen humanen MHC-Moleküle werden durch MHC-Gene kodiert und sind für jedes Individuum spezifisch, wie auch die „passenden“ dazu zugehörigen Rezeptoren (Trowsdale 2001). Dabei erkennt der NKG2A-Rezeptor die nicht-klassischen MHC-Klasse-1b-Moleküle (MHC-E) (Braud et al. 1998), während die inhibierenden KIRs an die klassischen MHC-Klasse-1a-Moleküle (MHC-A, -B und -C) binden (Moretta et al. 1996b; Parham 2005): KIR2DL1 an MHC-C2, KIR2DL2 und KIR2DL3 an MHC-C1, KIR3DL1 an MHC-Bw4 und KIR3DL2 an MHC-A3 und MHC-A11 (Parham 2005).

Durch die Bindung der inhibierenden Rezeptoren werden intrazellulär Immunrezeptor-tyrosinbasierte Inhibierungsmotive (engl. *immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs*, ITIMs) angeregt (Long 1999), die den Signalweg der aktivierenden Rezeptoren blockieren und damit körpereigene, gesunde Zellen vor der Zytotoxizität von NK Zellen schützen. Dieses Phänomen wird als sogenannte Selbsttoleranz bezeichnet (Abbildung 2).

Bei der Infektion mit einem Virus oder in maligne transformierten Zellen wird die Expression von MHC-Klasse-1-Molekülen herunterreguliert oder die MHC-Moleküle werden verändert (David-Watine et al. 1990; Garrido et al. 1997). Durch den MHC-Verlust fehlt die blockierende Wirkung der inhibierenden Rezeptoren und die NK Zelle wird aktiviert (Abbildung 2). Dieser Sachverhalt wurde als *Missing self*-Hypothese bezeichnet (Ljunggren und Kärre 1990) und erklärt, wie NK Zellen ohne vorherigen Antigenkontakt potenziell gefährliche Zellen von gesunden Zellen unterscheiden können.

Die Expression der inhibierenden Rezeptoren findet in den letzten Entwicklungsschritten statt (Freud und Caligiuri 2006). Dabei wird NKG2A vor den KIRs exprimiert (Cooley et al. 2007). So ist auf CD56<sup>bright</sup> NK Zellen die NKG2A-Expression bei fehlender KIR-Expression hoch, während auf den meisten CD56<sup>dim</sup> NK Zellen die

NKG2A-Expression herunter- und die KIR-Expression hochreguliert wird (mehr zu KIR-Expression siehe 1.4) (Jacobs et al. 2001; Ferlazzo et al. 2004; Cooley et al. 2007).



**Abbildung 2: Die *Missing self*-Hypothese am Beispiel der Transformation von gesunden Zellen in Tumorzellen: Durch den Verlust der MHC-Klasse-1-Moleküle bei der Transformation fehlen auf der Zelloberfläche die Liganden der inhibierenden NK Zell-Rezeptoren und die NK Zelle wird aktiviert.** (Ljunggren und Malmberg 2007)

Murine NK Zellen unterscheiden sich im Rezeptorrepertoire von humanen NK Zellen (Karlhofer et al. 1992). Sie exprimieren ebenso den NKG2A-Rezeptor, aber anstelle der KIRs exprimieren sie Ly49-Rezeptoren, die sich in ihrer Funktion, Expression und Vielfältigkeit nicht von den humanen KIRs unterscheiden (Karlhofer et al. 1992; Parham 2005).

### Aktivierende NK Zell-Rezeptoren

Während die KIRs und die NKG2-A-, -B- und -C-Rezeptoren MHC-Klasse-1-Moleküle erkennen, binden die aktivierenden NK Zell-Rezeptoren der NCR-Familie an andere, zum Teil noch nicht genau identifizierte Liganden, die auf „gestressten“ Zellen hochreguliert sind (Moretta et al. 2001). Die wichtigsten NCRs NKp30, NKp44 und NKp46 wirken zytotoxisch auf Tumorzellen (Moretta et al. 2001; Biassoni et al. 2000). NKp30 und NKp46 erkennen allogene und xenogene MHC-Klasse-1-defiziente Zellen und werden selektiv von allen ruhenden und aktivierten NK Zellen exprimiert, wobei die Rezeptordichte auf aktivierten NK Zellen erhöht ist (Sivori et al. 1997; Sivori et al. 1999; Pende et al. 1999; Moretta et al. 2001). Außerdem spielt NKp30 eine wichtige

Rolle in der Interaktion von NK Zellen und dendritischen Zellen (DCs) (Ferlazzo et al. 2002). Im Gegensatz dazu wird NKp44 nur auf – beispielsweise durch IL2 – aktivierten NK Zellen exprimiert und ist daher ein spezifischer Marker für aktivierte NK Zellen (Vitale et al. 1998). Zusammen mit den aktivierenden KIRs induzieren die NCR eine Zell-Aktivierung über die Phosphorylierung sogenannter Immunrezeptor-tyrosinbasierter Aktivierungsmotive (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*, ITAMs) (Biassoni et al. 2000).

Der NKG2D-Rezeptor induziert über die Koppelung an Adapterproteine (DAP10/KAP10) eine Signaltransduktion über die Phosphatidylinositol-3-Kinase (Wu et al. 1999; Chang et al. 1999). Seine Liganden sind MIC-Moleküle (Bauer et al. 1999) und ULBPs (*UL16 binding proteins*) (Cosman et al. 2001), deren Expression bei virusinfizierten Zellen und frisch transformierten Tumorzellen hochreguliert wird.

Neben diesen Antikörper-unabhängigen Rezeptoren steht der CD16-Rezeptor (FcγIIIa, Typ3-Rezeptor der Fc-Region von Immunglobulin(Ig)-G), der IgG-markierte Zellen erkennt und daraufhin der NK Zelle signalisiert, die markierte Zelle zu töten – sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (engl. *antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) (O'Shea et al. 1991; Bryceson et al. 2006).

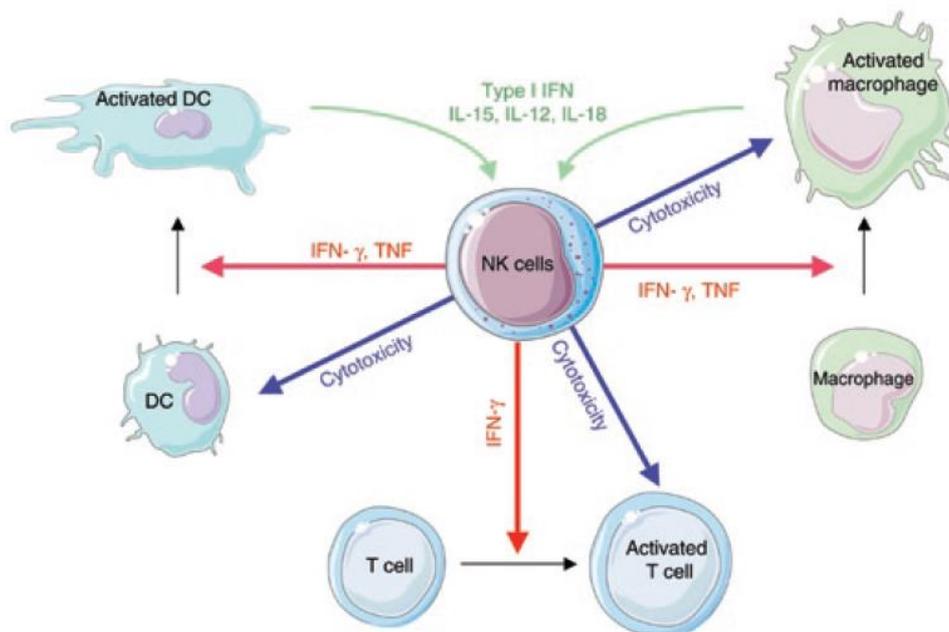
Außerdem exprimieren NK Zellen diverse Rezeptoren zur Bindung von Zytokinen, wie z.B. IL15 (siehe 1.3), und Chemokinen, die dadurch die NK Zell-Aktivität beeinflussen können (Cooper et al. 2001a; Inngjerdigen et al. 2001).

### **1.2.3 NK Zell-Funktionalität**

Die durch Rezeptorliganden aktivierten NK Zellen bewirken eine direkte Lyse der Zielzellen durch die Freisetzung von zytotoxischen Granula wie Perforin und Granzyme (Cooper et al. 2001b; Burkhardt et al. 1989; Tschopp und Nabholz 1990). Dabei durchdringen die Granula die Zellmembran der Zielzelle und leiten damit den programmierten Zelltod ein. Zielzellen sind sowohl maligne und virusinfizierte Zellen als auch Zellen des körpereigenen Immunsystems, wie Makrophagen, T-Zellen und dendritische Zellen (DCs) (Vivier et al. 2008). Dadurch gewinnen NK Zellen zunehmend an Bedeutung in der Stammzelltherapie von Leukämien, da sie nicht nur *Graft-versus-*

*Leukemia* (GvL)-Aktivität haben, sondern durch Eliminierung von Empfänger-DCs *Graft-versus-Host*-Erkrankungen (GvHD, D=engl. *Disease*, zu Dt. Erkrankung) verhindern (siehe 1.2.4) (Ruggeri et al. 2002).

Neben der zytotoxischen Aktivität setzen NK Zellen Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und IFN- $\gamma$  frei (Wright und Bonavida 1987; Cooper et al. 2001a). Zum anderen wird die NK Zell-Aktivität selbst durch Zytokine wie Interferone (IFN- $\alpha$  und - $\beta$ ) und Interleukine (IL12 und IL15) verstärkt (Robertson und Ritz 1990; Carson et al. 1994; Aste-Amezaga et al. 1994; Fehniger et al. 1999; Kenneth Murphy 2012). Ein Überblick über die Interaktion von NK Zellen mit Immunzellen und inflammatorischen Faktoren ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: NK Zellen interagieren mit anderen Zellen des Immunsystems.** Auf der einen Seite wird ihre Aktivität von Mediatoren wie Interferon (IFN)- $\alpha$ , - $\beta$ , Interleukin (IL) 12, IL15 und IL18 gesteigert, andererseits haben sie selbst eine zytotoxische Wirkung auf Zellen des Immunsystems und setzen ihrerseits wiederum Mediatoren wie den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und IFN- $\gamma$  frei. (Vivier et al. 2008)

Um die Funktionalität von NK Zellen im Labor zu verifizieren, werden zum einen sogenannte Zytotoxizitätsassays verwendet. Eine dafür häufig genutzte Zielzelle ist die Tumorzelllinie K562 (Robertson und Ritz 1990; Lozzio und Lozzio 1979). Zum anderen gibt es neuere Methoden die LAMP1 (engl. *lysosomal-associated membrane protein-1*, oder CD107a)-Expression auf NK Zellen zu bestimmen, da diese auf aktivierten NK

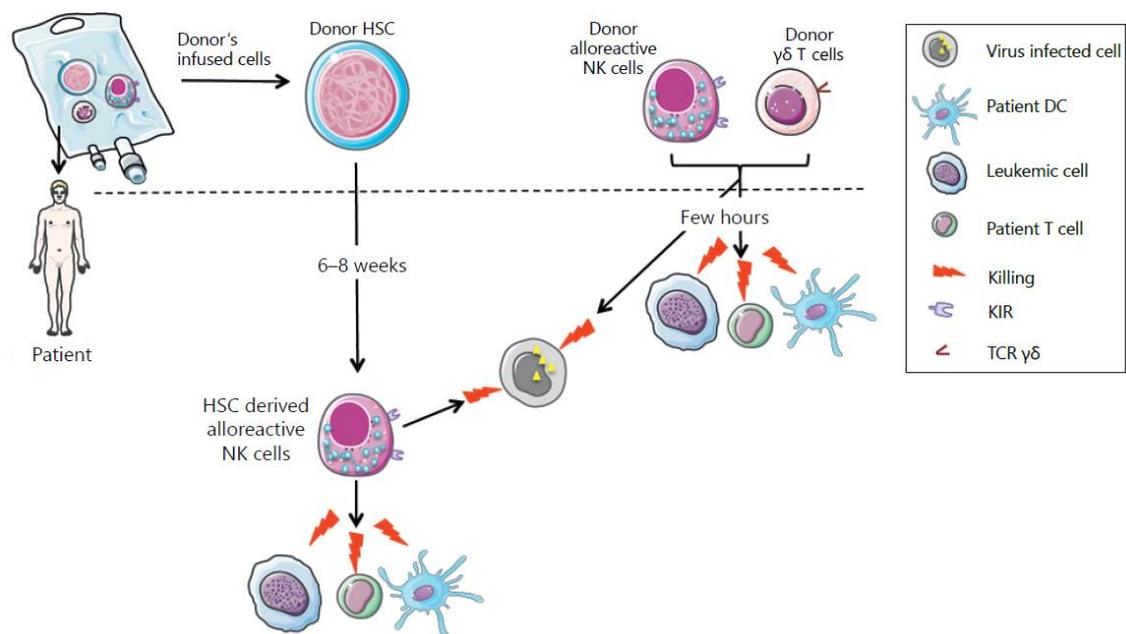
Zellen hochreguliert ist und mit der Zytokinproduktion und der NK Zell-vermittelten Lyse korreliert (Alter et al. 2004).

#### **1.2.4 Rolle von NK Zellen in der Stammzelltransplantation**

Die Stammzelltransplantation ist ein häufig verwendetes Therapiekonzept in der Behandlung von Tumorerkrankungen. Dabei unterscheidet man zwischen einer autologen Transplantation, bei der die Stammzellen vom Empfänger, und einer allogenen Transplantation, bei der die Stammzellen von einem fremden Spender entnommen werden. Bei der allogenen Transplantation werden möglichst MHC-identische Spender verwendet. Trotz großer Spender-Register kann nicht immer ein passender Spender gefunden werden. Deshalb werden heute als Spender häufig Familienmitglieder, die idealerweise Haplotyp identisch sind, herangezogen (Aversa et al. 1998). Die Rate an *Graft-versus-Host*-Erkrankungen (GvHD, D=engl. *Disease*, zu Dt. Erkrankung) korreliert mit dem Ausmaß der MHC-Inkongruenz, wenn nicht MHC-identische Spender ausgewählt werden, da sich Spender-T-Zellen bei ungenügender MHC-Kompatibilität gegen die fremden Zellen des Empfängers richten (Aversa et al. 1998; Ruggeri et al. 2001). Die Spender-T-Zellen im Transplantat stellen aber einen wichtigen Zell-basierten Bestandteil der Anti-Tumortherapie dar, weil sie Empfänger-T-Zellen, die das Transplantat angreifen würden, und restliche Leukämiezellen (*Graft-versus-Leukemia* (GvL)-Effekt) eliminieren (Bonnet et al. 1999).

Daher gab es Überlegungen NK Zellen in die Transplantationsstrategie mit einzubeziehen (Ruggeri et al. 1999; Ruggeri et al. 2001; Ruggeri et al. 2002). Wenn die für die inhibierenden KIRs der Spender-NK Zellen spezifischen MHC-Liganden auf der Oberfläche der Empfängerzellen fehlen (*MHC-Mismatch*) und diese daher als „fremd“ erkannt werden, kommt es zur NK Zell-Aktivierung. Es konnte beobachtet werden, dass diese sogenannten alloreaktiven NK Zellen die im Patienten verbliebenen Leukämiezellen vernichten, ohne selbst GvHDs auszulösen (Abbildung 4). Das Auftreten einer GvHD konnte durch Kotransplantation von NK Zellen sogar reduziert werden, da die NK Zellen die DCs des Empfängers eliminieren und dadurch das Priming von Spender-T-Zellen verhindern (Ruggeri et al. 2002). So konnte beispielsweise in

klinischen Studien mit an AML erkrankten Patienten bei einem *Mismatch* für MHC-C- oder MHC-B-Allele beobachtet werden, dass durch die Kotransplantation von alloreaktiven NK Zellen das Rezidivrisiko reduziert und die Überlebenschancen erhöht werden kann (Ruggeri et al. 2002; Ruggeri et al. 2001). Der NK Zell-vermittelte Anti-Tumor-Effekt zeigte sich dabei nicht für die adulte ALL (Ruggeri et al. 2001; Ruggeri et al. 2002). Dagegen konnte *in vitro* eine NK Zell-Zytotoxizität gegen die kindliche BCP-ALL beobachtet werden (Pfeiffer et al. 2007). Dabei fand sich ein Zusammenhang zwischen der Stärke der Lyse und dem Umfang des MHC-*Mismatch* zwischen Spender und Empfänger. Um die NK Zell-vermittelten GvL-Effekte gegen die kindliche BCP-ALL in individualisierter Form charakterisieren und die Leukämie-Therapie weiter optimieren zu können, wurde in unserer Arbeitsgruppe ein xenogenes Mausmodell etabliert, welches experimentelle *in vivo* Untersuchungen mit BCP-ALL, Stamm- und NK Zellen ermöglicht (André et al. 2010; Woiterski et al. 2013, Kübler et al., 2014).



**Abbildung 4:** Durch die gleichzeitige Transplantation alloreaktiver Spender-NK Zellen und Spender-T-Zellen mit den hämatopoetischen Stammzellen (HSC) können virusinfizierte Zellen, dendritische Zellen (DCs), T-Zellen und Leukämiezellen des Patienten direkt angegriffen werden. Aus den transplantierten HSC entstehen nach 6 bis 8 Wochen erste reife NK Zellen. (Abbildung aus Moretta et al. 2014)

### 1.3 Bedeutung des Zytokin IL15 für die NK Zell-Ontogenese und - Funktionalität

Interleukin 15 (IL15) spielt eine wichtige Rolle für die NK Zell-Biologie, in dem es v.a. die Differenzierung, Apoptose und Aktivität von NK Zellen moduliert (Waldmann und Tagaya 1999; Meazza et al. 2011). Gebildet wird IL15 u.a. von Monozyten, DCs und Stromazellen in verschiedenen Geweben wie dem Knochenmark, Thymus und sekundär lymphatischen Geweben, aber auch in der Plazenta, im Skelettmuskel, in Leber, Niere und Herz (Grabstein et al. 1994). Im Rahmen einer Inflammationsreaktion wirkt IL15 als Lockstoff, indem es einen chemotaktischen Einfluss auf NK Zellen ausübt und sie zum Ort des Geschehens dirigiert (Allavena et al. 1997).

Als Mitglied der *common gamma chain*-Zytokin-Familie hat IL15 wie die Interleukine IL2, IL4, IL7, IL9 und IL21 den  $\gamma$ -chain in seinem Rezeptorkomplex (Rochman et al. 2009; Meazza et al. 2011). Außerdem bindet IL15 an den IL2-Rezeptor IL2R $\beta$  und an ein Fragment seines eigenen, hoch affinen Rezeptors IL15R $\alpha$  (Bamford et al. 1994; Grabstein et al. 1994; Giri et al. 1995; Anderson et al. 1995). IL2 und IL15 haben neben ähnlichen Rezeptoren eine ähnliche Wirkung auf NK Zellen, aber auch ihre eigenen Funktionen (Carson et al. 1994; Leclercq et al. 1996; Waldmann et al. 2001; Pillet et al. 2011; Waldmann et al. 2001). Bei der NK Zell-Entwicklung wird IL15 über den IL15R $\alpha$ -Rezeptor auf akzessorischen Zellen dem IL15R $\beta\gamma$ -Rezeptor auf NK Zellen *trans*-präsentiert (Burkett et al. 2004; Lee et al. 2011).

Durch die IL15-Bindung wird unter anderem die NK Zell-Bildung, -Proliferation und -Differenzierung gesteigert (Carson et al. 1994; Lodolce et al. 1998; Huntington et al. 2009; Huntington et al. 2007; Huntington et al. 2009). Die Differenzierung von humanen CD34<sup>+</sup> Stammzellen zu funktionsfähigen CD56<sup>+</sup> NK Zellen ist unter *in vitro* Kulturbedingungen alleinig durch IL15-Supplementation möglich (Mrozek et al. 1996). Im Knochenmark wird IL15 beispielsweise von Stromazellen gebildet (Mrozek et al. 1996). Bei der Entstehung werden die IL15-Rezeptoren erstmals von NK Zell-Vorläuferzellen (CD34<sup>bright</sup> IL2/15R $\beta$ <sup>+</sup> IL15R $\alpha$ <sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen) exprimiert, sodass IL15 für die weitere Entwicklung in reife CD56<sup>+</sup> NK Zellen entscheidend ist (Yu et al. 1998;

Fehniger und Caligiuri 2001). So konnte auch in einem murinen Modell bei Fehlen von IL15 (Kennedy et al. 2000) ein Defizit bzw. das vollständige Fehlen von NK Zellen beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression von IL15 in Mäusen mit einem Transgen für humanes IL15 zu einer Expansion der NK Zell-Population (Marks-Konczalik et al. 2000).

Die NK Zell-Bildung kann durch die Koppelung von IL15 an seinen Rezeptor IL15R $\alpha$  weiter gesteigert werden (Rubinstein et al. 2006; Stoklasek et al. 2006; Huntington et al. 2009). Eine Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex *in vitro* und *in vivo* sowohl in IL15R $\alpha$ <sup>-/-</sup> Mäuse als auch in durch Stammzelltransfer humanisierte Rag2<sup>-/-</sup> $\gamma$ c<sup>-/-</sup> Mäuse kann die Bildung muriner bzw. humaner NK Zellen induzieren (Rubinstein et al. 2006; Stoklasek et al. 2006; Huntington et al. 2009). Unsere Arbeitsgruppe konnte beobachten, dass in humanisierten NSG Mäusen durch die intraperitoneale Gabe von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex ab Woche 12 nach Transplantation die Expression von CD16<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> NK Zellen induziert wird (André, unpublizierte Daten).

Des Weiteren konnte *in vitro* beobachtet werden, dass IL15 die Proliferation von CD56<sup>bright</sup> NK Zellen und KIR<sup>-</sup> NK Zellen, nicht aber von CD56<sup>dim</sup> NK Zellen steigert (Romagnani et al. 2007; Carson et al. 1994). Grund dafür ist wahrscheinlich, dass KIR<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK Zellen das terminale Stadium in der NK Zell-Differenzierung darstellen und die Vorstufen die proliferativ aktiveren Stadien sind.

Neben der Hochregulation des CD16-Rezeptors und der inhibitorischen KIRs führt IL15 zu einer Expressionssteigerung von weiteren Rezeptoren, wie beispielsweise den NCRs NKp30 und NKp44 (Rham et al. 2007).

Darüber hinaus erhöht IL15 das Überleben von NK Zellen (Carson et al. 1997; Cooper et al. 2002; Bulfone-Paus et al. 1997), unter anderem indem es über die Hochregulierung der Bcl 2-Expression anti-apoptotisch wirkt (Carson et al. 1997; Ranson et al. 2003). Der IL15R $\alpha$ -Rezeptor gilt auch in Zusammenhang mit dem Überleben von NK Zellen als besonders relevant, da man aus Versuchen von Prlic und seinen Kollegen weiß, dass nicht nur das Vorhandensein von IL15 essentiell für das Überleben von NK Zellen ist, sondern NK Zellen nach Transfer in eine IL15R $\alpha$ -negative Umgebung ebenso nicht überlebensfähig sind (Prlic et al. 2003). Das Fehlen der

Rezeptor- $\gamma$ -Kette in der NRG Maus führte nicht zu einem Verlust transferierter NK Zellen (Prlic et al. 2003). Daher verabreichten wir in unseren Untersuchungen humanes IL15 komplexiert mit seinem Rezeptor IL15R $\alpha$ .

Indem IL15 an der Differenzierung zu reifen, zytotoxischen KIR<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK Zellen beteiligt ist, hat es auch eine große Bedeutung für die Funktionalität von NK Zellen, da inhibitorische KIR-Moleküle wichtig für die NK Zell-Interaktion mit den MHC-Molekülen auf körpereigenen und -fremden Zellen sind (Anfossi et al. 2006). In früheren Studien konnte eine Steigerung der NK Zell-Zytotoxizität durch IL15 gemessen werden (Marks-Konczalik et al. 2000; Zhang et al. 2008). Für die Zytotoxizität sind Granzym B und Perforin wichtige Mediatoren (Fehniger et al. 2007). Deren Expression ist auf IL15-aktivierten NK Zellen erhöht (Fehniger et al. 2007). Auf andere Funktionen von NK Zellen, wie beispielsweise die Ausschüttung von Zytokinen, hat die alleinige IL15-Supplementation nur einen geringen Effekt (Carson et al. 1994). Die Zytokin-Ausschüttung wird v.a. durch IL12 und IL18 stimuliert (Cooper et al. 2001b). Die Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch die CD56<sup>bright</sup> NK Zellen wird durch hochdosierte IL15-Gabe sogar gehemmt (Keppel et al. 2015). In niedriger Dosierung kann bei Ko-Stimulation von IL12 mit IL15 eine gesteigerte Ausschüttung von IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL10 und TNF durch NK Zellen beobachtet werden (Carson et al. 1994; Fehniger et al. 1999).

Zusammenfassend ist IL15 also nicht nur ein entscheidender Induktor der NK Zell-Ontogenese, sondern als pro-inflammatorisches Zytokin auch ein Aktivator reifer NK Zellen (Mishra et al. 2014). So ist es nicht verwunderlich, dass IL15 in den letzten Jahren zunehmend interessanter für die Krebstherapie geworden ist (Fehniger et al. 2002; Waldmann 2006).

#### **1.4 Bedeutung der MHC-Klasse-1-Moleküle für die NK Zell-Ontogenese und -Funktionalität**

Wie schon in den vorherigen Kapiteln beschrieben, spielt die Interaktion von inhibierenden NK Zell-Rezeptoren (KIR (human), Ly49 (murin) und NKG2A (human und murin)) und MHC-Klasse-1-Molekülen auf Zelloberflächen eine wichtige Rolle für die

funktionelle Aktivität von NK Zellen. Reife NK Zellen aus MHC-Klasse-1-defizienten Mäusen und Menschen haben eine geringere Funktionalität (Höglund et al. 1991; Liao et al. 1991; Furukawa et al. 1999; de la Salle, H et al. 1994). Da diese NK Zellen inhibierende Rezeptoren exprimieren, scheint es, dass die Rezeptorbindung an eigenen MHC-Klasse-1-Molekülen für die Ausbildung funktioneller Kompetenz notwendig ist (Furukawa et al. 1999). Für die Entwicklung zu reifen, voll funktionsfähigen NK Zellen gibt es verschiedene Thesen und Modelle:

- *Licensing*-Hypothese: Funktionell inaktive und unreife NK Zellen erlangen durch die Bindung von ihren inhibierenden Rezeptoren (KIR, Ly49 und NKG2A) an eigene MHC-Klasse-1-Moleküle funktionelle Kompetenz (Kim et al. 2005; Yokoyama und Kim 2006; Kim et al. 2008).
- *Disarming*-Hypothese: Diese Hypothese beinhaltet, dass grundsätzlich alle NK Zellen aktiv sind und NK Zellen, die keine inhibierenden MHC-Klasse-1-spezifischen Rezeptoren exprimieren, inaktiviert werden (ihrer Aktivität entwaffnet (=disarmed)) (Raulet 2004; Raulet und Vance 2006).
- *Rheostat*-Model: Das *Rheostat* (=Regler)-Model beinhaltet die These, dass es nicht nur reaktive und weniger reaktive NK Zellen gibt, sondern dass das funktionelle Ansprechen durch die Anzahl und die Stärke der exprimierten inhibierenden Rezeptoren mit spezifischen körpereigenen MHC-Klasse-1-Liganden dynamisch geregelt wird (Johansson et al. 2005; Joncker et al. 2009; Brodin et al. 2009b; Brodin et al. 2009a). NK Zellen, die drei Rezeptoren für spezifische MHC-Moleküle exprimieren, haben eine 2-3fach höhere Aktivität als NK Zellen mit nur einem Rezeptor und eine 10fach höhere Aktivität als NK Zellen ohne Rezeptoren für spezifische MHC-Moleküle (Joncker et al. 2009).

Welchen Prozess NK Zellen nun genau durchlaufen, ist bislang unklar. Sicher bleibt, dass NK Zellen, die einen inhibierenden Rezeptor für einen MHC-Klasse-1-Liganden tragen, funktionell kompetent sind und in der Lage sind, körpereigene gesunde von MHC-defizienten Zellen zu unterscheiden (Anfossi et al. 2006; Raulet und Vance 2006; de la Salle, H et al. 1994).

Die jahrelange Vermutung, dass die Rezeptor-MHC-Interaktion auch essentiell für die Ausbildung der „Selbst“-Toleranz von NK Zellen ist und reife NK Zellen mindestens einen Rezeptor für die „Selbst“-Erkennung exprimieren (Valiante et al. 1997), wird heute in Frage gestellt, da man bei frisch isolierten peripheren NK Zellen immer auch eine Fraktion von NK Zellen findet, die keine inhibierenden Rezeptoren exprimieren und trotzdem selbsttolerant sind (Anfossi et al. 2006; Yawata et al. 2008; Fernandez et al. 2005; Yu et al. 2007). Vermutlich resultiert hier die Selbsttoleranz aus funktioneller Inkompetenz, da diese NK Zellen – auch wenn sie ansonsten den gleichen Phänotyp wie  $KIR^+$  und/oder  $NKG2A^+$  NK Zellen haben – nur schwach auf die Anwesenheit MHC-defizienter Zellen, Tumorzellen oder Aktivierung durch aktivierende Rezeptoren reagieren (sie sind *hyporesponsiv*=wenig reaktiv) (Fernandez et al. 2005; Kim et al. 2005; Yu et al. 2007). Trotzdem nimmt man an, dass sie einen wichtigen Bestandteil der NK Zell-Population in Organismen darstellen, da beispielsweise durch fehlende Rezeptor-MHC-Interaktion *hyporesponsiv* gebliebene NK Zellen in MHC-defizienten Mäusen Virus-Infektionen bekämpfen können (Tay et al. 1995; Orr et al. 2010).

Darüber hinaus ist die funktionelle Reifung von NK Zellen kein Prozess, der nur in der Entwicklung der NK Zellen im Knochenmark stattfindet und sich dann nicht mehr verändern lässt (Elliott et al. 2010; Joncker et al. 2010). Transferiert man murine, reife, *hyporesponsive* NK Zellen aus MHC-defizienten Mäusen in MHC-suffiziente Mäuse, steigern sie ihre Funktionalität gegen MHC-defiziente Tumorzellen in Bezug auf die Ausschüttung von Zytokinen wie  $IFN-\gamma$  und die Zytotoxizität (Elliott et al. 2010; Joncker et al. 2010). Andersherum verringert sich das funktionelle Potential von NK Zellen aus MHC-suffizienten Mäusen nach adoptivem Transfer in MHC-defiziente Mäuse (Joncker et al. 2010).

Insgesamt scheint es, dass die Interaktion inhibitorischer KIRs mit ihren MHC-Klasse-1-Liganden entscheidend für die funktionelle Kompetenz von NK Zellen ist, so führt eine Aktivierung durch IL15, bei  $KIR^- NKG2A^-$  NK Zellen zu einer Hochregulation der KIRs und damit zu einer Funktionssteigerung (Cooley et al. 2007; Romagnani et al. 2007).

## **1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit**

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnten in NSG Mäusen nach Transplantation von humanen hämatopoetischen Stammzellen unter alleiniger Supplementation mit IL7 nur funktionell anerge NK Zellen generiert werden (André et al. 2010). Um derartige murine Xenotransplantationsmodelle für die Erforschung NK Zell-vermittelter Tumoreffekte zu optimieren, wurden in dieser Dissertation humane NK Zellen nach adoptivem Transfer in verschiedenartige murine Modelle untersucht und charakterisiert, welchen Einfluss die zusätzliche Supplementaion des Zytokin IL15 oder die Präsenz eines humanen MHC-Moleküls durch die Expression eines zusätzlichen humanen MHC-B27-Transgens in der Maus auf den Phänotyp und die Funktionalität von NK Zellen haben.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Allgemeine Materialien

**Tabelle 1: Geräte, Glas und Plastik**

Geräte, Glas und Plastik	Firma
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH
Cryo-Röhrchen 1 ml	Corning Incorporated
Falcon-Röhrchen: 15; 50 ml	Becton Dickinson (BD) GmbH
Mikrotiterplatte U-Form	Greiner Bio-One GmbH
Pipettenspitzen	Sarstedt
Reaktionsgefäße: 1; 1,5; 2 ml	Eppendorf
Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraeus Instruments GmbH
Spritzen: 1, 2, 5, 10, 20, 50 ml	BD Plastikpak
Sterile Plastikpipetten: 5; 10; 25 ml	Corning Incorporated
Verstellbare Pipetten (Pipetman)	Abimed HAT, Gilson
Zellsieb 40 µm	BD Falcon
Zentrifugen	Andreas Hettich GmbH & Co. KG

**Tabelle 2: Stammlösungen**

Stammlösungen	Firma
Phosphat buffered saline (PBS)	Sigma-Aldrich Co.
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Medium:	
500 ml RPMI 1640 Medium	Biochrom AG
+ 50 ml Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
+ 5 ml L-Glutamin (200 mM)	Biochrom AG
+ 5 ml Penicillin (10000 U)/Streptomycin (10 mg/ml)	Biochrom AG

FACS-Puffer: 500 ml PBS + 1,66 ml Bovine serum albumin (BSA) 30 % + 5 ml Natriumazid 10 %	Sigma-Aldrich Co
MACS-Puffer: 500 ml PBS + 10,6 ml EDTA (250 mM) + 10 ml Humanalbumin 20 %	Sigma-Aldrich Co.Universitätsapotheke CSL Behring GmbH
Lyse-Puffer: 1000 ml + 8,29 g Ammoniumchlorid + 1 g Kaliumhydrogencarbonat + 0,0372 g Na <sub>2</sub> -EDTA-2H <sub>2</sub> O	Universitätsapotheke Tübingen

### 2.1.2 Material zur NK Zell-Gewinnung

**Tabelle 3: Material zur NK Zell-Gewinnung**

Bezeichnung	Firma
Peripheres Vollblut	Freiwillige Spender, Leukapherisatreste
Medunasal®-Heparin	Medical Device
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom AG
CD56 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH
AntiCD56	Miltenyi Biotec GmbH
MACS-Puffer	siehe Tabelle 2
Vario MACS (Magnet)	Miltenyi Biotec GmbH
Separationssäule LS, MS	Miltenyi Biotec GmbH

### 2.1.3 Zytokine

**Tabelle 4: Zytokine**

Bezeichnung	Firma
IL15	Cellgenix, Freiburg, Germany
IL15R $\alpha$	R&D, Wiesbaden, Germany

### 2.1.4 Material für die Durchflusszytometrie

**Tabelle 5: Material für die Durchflusszytometrie**

Material	Firma
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson GmbH
Aufnahme- und Auswertesoftware FACS-Diva	BD Biosciences
Auswertesoftware FCS-Express	De Novo Software
Auswertesoftware Excel	Microsoft
FACS-Analyseröhrchen: 5; 1,5 ml; Rundboden	BD Falcon
FACS-Puffer	Siehe Tabelle 2
Carboxyfluorescein(diacetat) succinimidyl ester (CFSE)	Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit®, Invitrogen, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 350 Succinimidyl Ester (ARD)	Invitrogen GmbH

**Tabelle 6: Antikörper**

Antigen	Farbe	Hersteller	Klon
CD3	PerCP	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	SK7
CD16	AF700	ExBio Praha (Vestec, Tschechien)	3G8
CD56	bv421	BioLegend	HCD56
CD158a	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	HP-3E4
CD158b	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	GL183
CD158e	PE	BD Biosciences (Heidelberg, Deutschland)	DX9
CD158e	APC	R&D Systems (Wiesbaden, Deutschland)	DX9
CD159a (NKG2A)	APC	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	Z199
CD314 (NKG2D)	APC	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)	BAT221
CD336 (NKp44)	PE	Beckman Coulter (Krefeld, Deutschland)	Z231
IgG1	PE	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)	PPV-06
IgG1	APC	ImmunoTools (Friesoythe, Deutschland)	PPV-06

### 2.1.5 Humane NK Zellen

Die verwendeten humanen NK Zellen wurden aus dem Blut bzw. dem Leukapherisat freiwilliger Spender (insgesamt vier) isoliert. Dabei zeichneten sich die Spender durch folgenden MHC-Genotyp aus:

Spender 1 = MHC-Bw4/Bw4, MHC-C2/C1

Spender 2 = MHC-Bw6/Bw4, MHC-C2/C2

Spender 3 = MHC-Bw6/Bw4, MHC-C2/C1

Spender 4 = MHC-Bw6/Bw4, MHC-C2/C1

### 2.1.6 K562-Zelllinie

Bei der ältesten leukämischen Tumorzelllinie K562 handelt es sich um erythroleukämische Vorläuferzellen einer chronisch myeloischen Leukämie (CML, Lozzio et al., 1975). Die K562-Zellen zeichnet eine MHC-Klasse-1-Defizienz aus, die zur Aktivierung von NK Zellen führt, welche daraufhin beginnen, die Tumorzellen zu eliminieren. Daher sind sie gut geeignet um in *in vitro* Zytotoxizitätstests die Funktionalität von NK Zellen zu charakterisieren.

Die Kultivierung erfolgte mit ca.  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml RPMI Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank HeraCell der Marke Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Bonn, Deutschland).

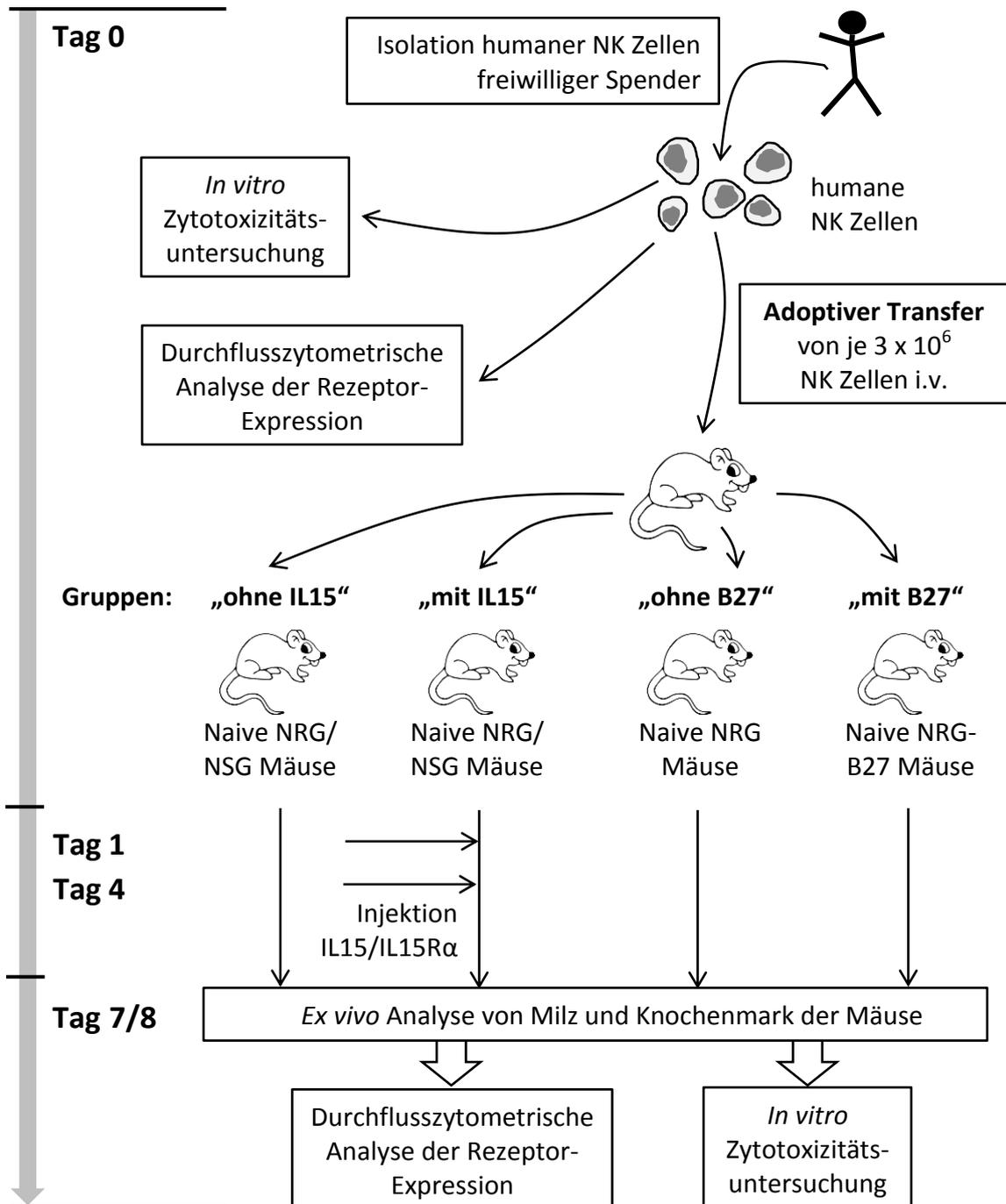
### 2.1.7 Versuchstiere

Die Versuche erfolgten mit NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tmWjl</sup>/Sz (NSG), NOD.Cg-Rag1<sup>tm1Mom</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NRG) und NRG-B27 Mäusen. Der NSG Mausstamm wurde käuflich bei Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) erworben, die NRG und NRG-B27 Mäuse wurden der AG André freundlicherweise durch L. Shultz, Jackson Laboratories, überlassen. Sämtliche Mausstämme wurden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen im Tierstall der Unikinderklinik Tübingen gehalten. Die in Deutschland gültigen gesetzlichen Bestimmungen zur Durchführung von Tierversuchen wurden eingehalten. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Regierungspräsidium Stuttgart (Tierschutzanträge K2/07 und K4/10).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsaufbau

Als erstes wurden humane NK Zellen aus dem Blut freiwilliger Spender isoliert und in einem zweiten Schritt über die Schwanzvene in NRG bzw. NSG Mäuse injiziert. Dabei wurde ein Teil in NRG Mäuse injiziert, welche das humane MHC-B27-Transgen exprimieren. Außerdem erhielt ein anderer Teil der Mäuse nach AT humaner NK Zellen an Tag 1 und 4 IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex supplementiert. So bilden sich mit den Kontrollgruppen insgesamt vier Mausgruppen: „ohne IL15“, „mit IL15“, „ohne B27“ und „mit B27“. Nach 7 oder 8 Tagen wurde die Euthanasie der Mäuse durchgeführt und Milz und Knochenmark (KM) der Mäuse analysiert, da dort die transferierten humanen NK Zellen wieder zu finden sind. Sowohl vor (Tag 0) als auch nach AT (Tag 7 oder 8) wurde der Phänotyp der NK Zellen mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Expression der Rezeptoren KIR, NKG2A, NKG2D und NKp44 und die Funktionalität mittels *in vitro* Zytotoxizitätsuntersuchung charakterisiert. Eine Übersicht über den Ablauf der Versuche ist in Abbildung 5 dargestellt.



**Abbildung 5: Versuchsaufbau der adoptiven Transfer-Experimente.** Ein Versuch umfasste mehrere Schritte an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen.

### 2.2.2 Übersicht über die verwendeten Mäuse

Insgesamt wurden Experimente mit 4 verschiedenen Spendern und 33 Mäusen durchgeführt. Ein Überblick über die verwendeten Mäuse je Spender ist in Tabelle 7 dargestellt.

**Tabelle 7: Die adoptiven Transfer-Versuche erfolgten mit humanen NK Zellen von 4 Spendern in NSG und NRG bzw. NRG-B27 Mäuse.** Dargestellt ist ein Überblick über die je Spender verwendeten Mäuse in den einzelnen Gruppen.

Mausgruppe	ohne IL15	mit IL15	ohne B27	mit B27
Spender 1	-	-	2 NRG Mäuse	3 NRG-B27 Mäuse
Spender 2	4 NRG Mäuse*	4 NRG Mäuse	4 NRG Mäuse*	4 NRG-B27 Mäuse
Spender 3	5 NSG Mäuse	5 NSG Mäuse	-	-
Spender 4	2 NRG Mäuse*	2 NRG Mäuse	2 NRG Mäuse*	2 NRG-B27 Mäuse

\* Diese Mäuse bilden die Kontrollgruppe, sowohl für die Gruppe „mit IL15“ als auch für die Gruppe „mit B27“ des jeweiligen Spenders und sind daher in der Tabelle doppelt aufgeführt.

### 2.2.3 Zellzahl-Bestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mittels Neubauer-Zählkammer. Dabei wurde die Zellsuspension 1:10 oder 1:100 mit Trypanblau verdünnt, in die Zellkammer pipettiert und die 4 Großquadrate unter dem Mikroskop ausgezählt. Trypanblau hat dabei den Vorteil, dass man zwischen lebenden (ungefärbten) und toten (dunkelblauen) Zellen unterscheiden kann.

Bei einem Volumen von 0,1 µl pro Großquadrat berechnet sich die Zellzahl wie folgt:

$$\text{Zellen pro ml} = \frac{\text{Zellsumme insgesamt}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Außerdem wurde die Zellzahl von humanem Blut maschinell mit dem Zellzählgerät Cobas Micros OT (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) bestimmt.

### 2.2.5 Isolierung von PBMCs

#### Methodischer Hintergrund

Die Isolierung von PBMCs (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*, z. Dt.: mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) aus humanem Blut erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Hypaque, einem synthetischem Polymer aus Saccharosemonomeren. Dabei wird der Dichteunterschied von Zellen und Suspensionen genutzt, der dazu führt, dass sich die Populationen nach Zentrifugation in mehrere Schichten im Falcon aufteilen (von unten nach oben, von hoher Dichte (=“schwere“ Zellen) zu geringer Dichte (=“leichte“ Zellen)):

1. Schicht: Erythrozyten, Granulozyten, tote Zellen
2. Schicht: Ficoll-Hypaque
3. Schicht: PBMCs
4. Schicht: Thrombozyten und Plasma

#### Proben

Je 200 bis 300 ml heparinisieretes Blut freiwilliger Spender.

#### Durchführung

- 15 ml Ficoll in 50ml-Falcon vorlegen
- Blut 1:1 mit PBS verdünnen und vorsichtig auf den Ficoll schichten
- Zentrifugation 25 Min. bei 500xg ohne Bremse (20 °C)
- Vorsichtiges Abnehmen der Interphase mit mononukleären Zellen (3. Schicht) mit steriler Pipette und Aufnahme in 50ml-Falcon
- Zentrifugation 10 Min. bei 500xg mit Bremse (20 °C)
- Waschschrift: Zellpellet in 1ml PBS aufnehmen, Zellen zählen, erneut mit PBS waschen
- Zentrifugation 10 Min. 350xg mit Bremse (20 °C)
- Anschließend sofortige Weiterverarbeitung oder Kultivierung der Zellen über Nacht, dazu Zellen in Medium aufnehmen (1 ml Medium pro  $2 \times 10^6$  Zellen)

## 2.2.6 Isolierung von NK Zellen mittels MACS

### Methodischer Hintergrund

MACS (*Magnet-activated cell sorting*) ist eine Methode bei der zellpopulations-spezifische Antigene durch mit Eisenoxid-konjugierten Antikörpern magnetisch geladen werden. Dadurch bleiben sie in einer mit paramagnetischer Eisenmatrix gefüllten Trennsäule, die sich in einem starken Magnetfeld befindet, hängen, während nicht-markierte Zellen die Trennsäule passieren. Nach der abgeschlossenen Zellseparation wird die Säule aus dem Magnetfeld genommen und die markierten Zellen werden eluiert.

Man unterscheidet zwischen Positiv-Selektion, bei der die relevanten Zellen magnetisch markiert werden, und Negativ-Selektion, bei der alle irrelevanten Zellen magnetisch markiert werden. Für die Experimente in dieser Arbeit wurde die Negativ-Selektion verwendet (CD56negativ Depletions Kit: 130-092-657). Dabei werden Nicht-NK Zellen, z.B. T-Zellen, B-Zellen, Stammzellen, dendritische Zellen, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten mittels eines Cocktails Biotin-konjugierter monoklonaler Antikörper markiert und in einem zweiten Schritt mit Streptavidin-gekoppelten Molekülen konjugiert.

Diese Methode der „Immunmagnetischen Zellseparation“ ist sehr effektiv. Mit vergleichsweise wenig Aufwand kann bei guter Ausbeute von über 90 % eine hohe Reinheit von 95-99,9 % erzielt werden.

### Proben

PBMCs der freiwilligen Spender (Spender 2 und 4) bzw. des Leukapherisats (Spender 1 und 3)

### Durchführung

- Zellpellet in 40 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen resuspendieren
- 10 µl NK Zell Biotin-Antikörper Cocktail pro  $10^7$  Zellen zugeben
- Mischen und 5 Min. bei 2-8 °C inkubieren
- 30 µl MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen zugeben

- 20 µl NK Zell Biotin-Antikörper Cocktail pro  $10^7$  Zellen zugeben
- Mischen und 10 Min. bei 2-8 °C inkubieren
- Mit MACS-Puffer auf ein Mindestvolumen von 500 µl auffüllen und Zellsuspension in die vorbereitete und mit MACS-Puffer gespülte Trennsäulen geben (Spülvolumen in Falcon 1 auffangen)
- 3-mal mit 500 µl für eine MS-Säule bzw. 3 ml für LS-Säule spülen (Spülvolumen in Falcon 1 auffangen)
- Trennsäule aus Magnetfeld entfernen und direkt mit 1 bzw. 5 ml ausspülen (Spülvolumen in Falcon 2 auffangen)
- Falcon 1 beinhaltet die NK Zellen, Falcon 2 kann verworfen werden
- Zentrifugation von Falcon 1 und 2-mal waschen, Zellzahl und Reinheit der NK Zellen bestimmen und Zellpellet in PBS aufnehmen ( $3 \times 10^6$  NK Zellen in 100 oder 200 µl PBS)

### **2.2.7 Tierexperimenteller Versuchsteil**

Sämtliche Maßnahmen an lebenden Tieren wurden unter Aufsicht von MTA B. Goecke, Dipl. biochem. A. Kübler oder Dr. rer. nat. J. Woiterski durchgeführt.

#### **Genotypisierung der NRG(-B27) Mäuse**

- Isolierung der Maus-DNA aus dem Ohrpunktat
- Polymerase-Kettenreaktion (PCR) des B27-Transgen zur Genotypisierung der NRG(-B27) Mäuse

#### **Adoptiver Transfer von NK Zellen in NSG, NRG und NRG-B27 Mäuse (Tag 0)**

Je  $3 \times 10^6$  Zellen NK Zellen in 100 oder 200 µl PBS wurden über die Schwanzvene in die Maus injiziert.

### **Supplementation von IL5/IL15R $\alpha$ -Komplex (Tag 1 und 4)**

An Tag 1 und Tag 4 wurden den Mäusen intraperitoneal 2,5  $\mu$ g humanes IL15 (= 50  $\mu$ l bei 50  $\mu$ g IL15 gelöst in 1 ml PBS) und 7,5  $\mu$ g humanes IL15R $\alpha$ -Fc (= 75  $\mu$ l bei 100 $\mu$ g IL15R $\alpha$  gelöst in 1 ml PBS) in insgesamt 125  $\mu$ l PBS gelöst injiziert.

### **Euthanasie und Probenentnahme (Tag 7 oder 8)**

- Euthanasie der Mäuse mittels CO<sub>2</sub>-Gas
- Entnahme der Milz und des Knochenmarks
- Organe durch Zellsieb drücken und mit PBS spülen

### **Lyse der Milzen**

- Lyse der Milz mit ACK-Lysepuffer für 3-5 Min.
- Abstoppen der Reaktion mit PBS

## **2.2.8 Analyse mittels Durchflusszytometrie**

### **Methodischer Hintergrund**

Mit der Methode der Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated-cell-sorting*=FACS) können Aussagen über Größe, Oberflächeneigenschaften und intrazellulärer Zusammensetzung von Zellen einer Zellsuspension gemacht werden. Zur Charakterisierung werden die Zellen beschleunigt, sodass tausende Zellen in einem linearen Probenstrom einzeln an einem Laser vorbeigeleitet werden können. Dabei wird die gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter FSC) ist ein Maß für die Größe der Zellen (je größer die Zelle, desto größer die Streuung), während das in einem rechten Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (Sidescatter SSC) als Maß für die Zellgranularität gilt (je höher die Zellgranularität, desto größer die Streuung). Stellt man bei einer Vollblutprobe beide Werte FSC und SSC gegenüber (scatter plot), ergibt sich ein charakteristisches Verteilungsmuster der Populationen in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten.

Zur Immunphänotypisierung von Zellen können Zellantigene mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert werden, welche dann, durch den Laser

angeregt, Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Durch die Nutzung verschiedener Fluoreszenzen können so mehrere Antigene gleichzeitig markiert und gemessen werden. Zum Auffangen und zur Aufschlüsselung der abgehenden Strahlung ist ein System aus verschiedenen Spiegeln und Filtern notwendig, welches die Strahlung nach ihren Wellenlängenbereichen auftrennt. Die einzelnen Anteile können dann von verschiedenen Detektoren registriert werden.

Für unsere Messungen nutzten wir folgende Fluoreszenzfarbstoffe: FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PerCP (Peridinin Chlorophyll Protein), APC (Allophycocyanin), PeCy7 (PE mit Cyanin 7 gekoppelt), bv421 (blue violet 421) und AF700 (Alexa Fluor 700). Als Durchflusszytometer verwendeten wir den LSR II der Becton Dickinson GmbH, bei dem es möglich ist, mehr als 8 Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren. Die Aufnahme der Daten erfolgte mit der Aufnahmesoftware FACS-Diva von Becton Dickinson GmbH.

### **Proben**

Bestimmung der NK Zell-Frequenz:

- PBMCs und lysierte Milz für *in vitro* Zytotoxizitätstest
- Reinheit der isolierten NK Zellen

Bestimmung des NK Zell-Phänotyps mittels Cocktailfärbung:

- PBMCs und lysierte Milz und KM

Lebend-Tot-Färbung mit ARD:

- K562-Zellen nach *in vitro* Zytotoxizitätstest

### **Durchführung**

Färbung zur Bestimmung der NK Zell-Frequenz:

- Zellen in FACS-Analyseröhrchen geben und mit 0,2-1 ml FACS-Puffer waschen
- Zentrifugation 5 Min. bei 400xg mit Bremse (4 °C)
- Zellpellet in 50 µl FACS-Puffer aufnehmen und Antikörper zugeben:
  - 1 µl CD56 bv421 (Verhältnis 1:50) und

- 0,5 µl CD3 PerCp (Verhältnis 1:100)
- Inkubation 10 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln
- Waschen und zentrifugieren (s. oben)

Cocktailfärbung zur Bestimmung des NK Zell-Phänotyps:

- Cocktails ansetzen: je Probe 50 µl Cocktail aus Antikörpern und FACS-Puffer
- Cocktail 1: inhibierende NK Zell-Rezeptoren
- Cocktail 2: aktivierende NK Zell-Rezeptoren
- Isotyp-Cocktail als Negativkontrolle

**Tabelle 8: Cocktails**

	<b>Antikörper</b>	<b>Verhältnis</b>		<b>Antikörper</b>	<b>Verhältnis</b>
<b>Cocktail 1a</b>	Alle KIRs PE (CD158 a, b + e)	1:50	<b>Cocktail 1b</b>	Alle KIRs PE (CD158 a, b + e)	1:50
	CD158e APC	1:100		NKG2A APC	1:10
	CD16 AF700	1:50		CD16 AF700	1:50
	CD56 bv421	1:50		CD56 bv421	1:50
	CD3 PerCP	1:100		CD3 PerCP	1:100
<b>Cocktail 2</b>	NKp44 PE	1:25	<b>Isotyp</b>	IgG1 PE	1:25
	NKG2D APC	1:25		IgG1 APC	1:25
	CD16 AF700	1:50		CD16 AF700	1:50
	CD56 bv421	1:50		CD56 bv421	1:50
	CD3 PerCP	1:100		CD3 PerCP	1:100

- Zellen in U-Well-Platte geben
- Zentrifugation 3 Min. bei 400xg mit Bremse (4 °C)
- Zellpellet mit 200 µl FACS-Puffer waschen und erneut zentrifugieren
- Zellpellet in 50 µl Cocktail aufnehmen
- Inkubation 20 Min. bei 4 °C im Dunkeln
- 1-mal waschen (s. oben)
- Zellpellet in 200 µl PBS aufnehmen
- Je 0,1 µl ARD (je nach Konzentration) zugeben
- Inkubation 10 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln

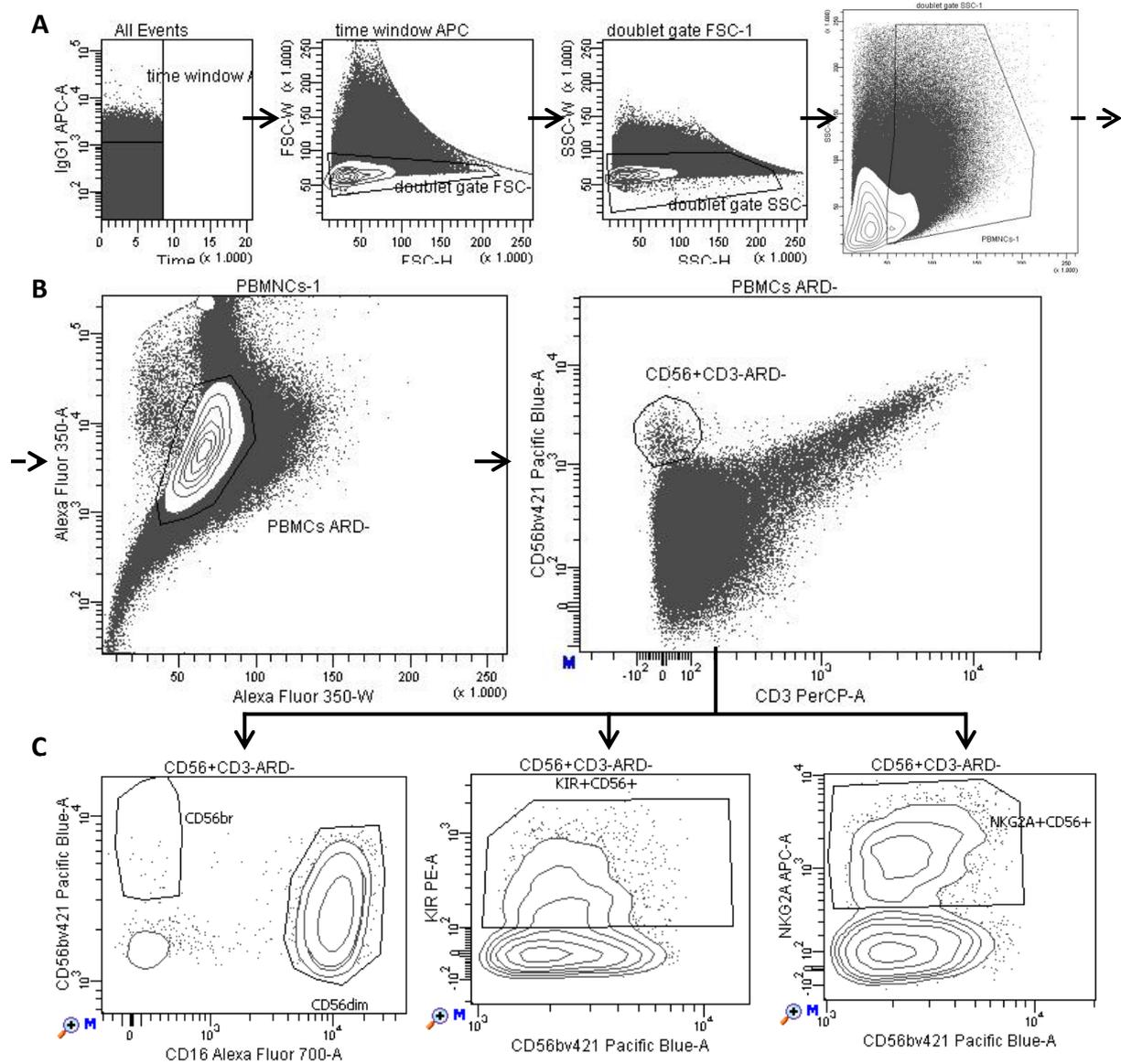
- 2-mal waschen
- Zum Messen Proben in 50-100  $\mu$ l FACS-Puffer in FACS-Analyseröhrchen geben

Lebend-Tot-Färbung mit ARD:

- Zentrifugation 5 Min. bei 400xg mit Bremse (4 °C)
- Zellpellet mit 200  $\mu$ l PBS waschen und erneut zentrifugieren
- Zellpellet in 200  $\mu$ l PBS aufnehmen
- Je 0,1  $\mu$ l ARD (je nach Konzentration) zugeben
- Inkubation 10 Min. bei Raumtemperatur im Dunkeln
- 2-mal waschen
- Zum Messen Proben in 50-100  $\mu$ l FACS-Puffer in FACS-Analyseröhrchen geben

### **Auswertung**

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der Auswertesoftware FACS-Diva von Becton Dickinson GmbH. Die *Gating*-Strategie ist in Abbildung 6 dargestellt. Dabei wurden die Messdaten zweidimensional dargestellt, sodass zwei Parameter je Diagramm gegenüber gestellt werden konnten: ein Parameter auf der x- und einer auf der y-Achse. Dadurch kann man Zellpopulationen voneinander abgrenzen und einzelne Populationen durch das Setzen von *Gates* zu Gruppen zusammenfassen. Diese können in weiteren Diagrammen separat analysiert werden, sodass beispielsweise die Expression von Zelloberflächenmolekülen auf einzelnen Zellpopulationen genau bestimmt werden kann.



**Abbildung 6: Gating-Strategie am Beispiel von Cocktail 1b.** Dargestellt sind die Messdaten der durchflusszytometrischen Analyse der PBMCs in zweidimensionalen Dot- bzw. Konturplots zum Gating (A) der PBMCs über die Auftrennung mittels Forward- und Side scatter, (B) der CD56 live cells ( $CD56^+CD3^-ARD^-$ ) der PBMC-Population und (C) der  $CD56^{bright}$ ,  $CD56^{dim}$ ,  $KIR^+CD56^+$  und  $NKG2A^+CD56^+$  NK Zellen der CD56 live cells.

### 2.2.9 *In vitro* Zytotoxizitätstest: NK Zell-Funktionalitätstest

#### Methodischer Hintergrund

Um die zytotoxische Funktion von NK Zellen zu verifizieren, finden so genannte *in vitro* Zytotoxizitätstest Anwendung. Dabei wird als Zielzelle häufig die Tumorzelllinie K562 verwendet, da in *in vitro* Kultur von K562-Zellen mit NK Zellen die NK Zell-Aktivität sehr

sensitiv ermittelt werden kann (Lozzio und Lozzio 1979). Dazu werden K562-Zellen zunächst mit *Carboxylfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) markiert. So kann nach Inkubation mit NK Zellen für 5 Stunden durchflusszytometrisch mittels ARD Lebend-Tot-Färbung der Anteil an toten K562-Zellen (=ARD<sup>+</sup>CFSE<sup>+</sup> Zellen) ermittelt werden. Durch das parallele Ansetzen einer K562-Monokultur kann über die Ermittlung der spontanen Lyse und der Lyse der Zielzellen mit NK Zellen die spezifische Zytotoxizität der NK Zellen berechnet werden (siehe unten: Auswertung).

### Proben

- PBMCs (Tag 0, Funktionalitätstest der NK Zellen vor AT)
- Lysierte Milzzellen (Tag 7/8, Funktionalitätstest der NK Zellen nach AT)

### Durchführung

- CFSE *labelling* der K562-Zelllinie (Tag -1 bzw. Tag 6/7)
  - Waschen der Zellen mit PBS
  - K562-Zellen abzentrifugieren (400xg, 3 Min.) und in 1 ml PBS aufnehmen
  - Zellen zählen: 10 µl Zellsuspension + 90 µl Trypanblau
  - Zellen abzentrifugieren
  - In PBS aufnehmen, sodass  $10 \times 10^6$  Zellen /ml
  - CFSE vorbereiten: 1 µl *stock solution* 10 mM auf 1000 µl PBS → 10 µM *working solution*
  - 100 µl *working solution* + 400 µl PBS → 2 µM Lösung
    - o diese 1:1 mit 500 µl Zellen in PBS mischen (entspricht Zielkonzentration 1 µM)
  - 15 Min. in Brutschrank inkubieren
  - Abstoppen der Reaktion mit 3 ml FCS 2 Min. bei Raumtemperatur
  - Mit 10 ml Medium auffüllen, Zentrifugieren 400xg 4 Min.
  - In 2 ml Medium aufnehmen und Brutschrank bei 37 °C über Nacht kultivieren

- Testansatz anfertigen (Tag 0 bzw. Tag 7/8)
  - Zielkonzentrationen ( $0,5 \times 10^6$  Zellen pro ml) einstellen (dazu Zellen zählen in Neubauer-Zählkammer):
    - NK Zellen: 50 000 NK Zellen pro 100  $\mu$ l Medium (dafür NK Zell-Frequenz an PBMCs bzw. der Milzzellen bestimmen)
    - K562-Zellen: 10 000 K562-Zellen in 20  $\mu$ l Medium
  - Zellsuspensionen in U-förmige Mikrotiterplatte pipettieren:
    - E:T 5:1 (E=*effector cell*, T=*target cell*): 100  $\mu$ l NK Zellen + 20  $\mu$ l K562-Zellen + 80  $\mu$ l Medium pro *well* (3-5 *wells*)
    - Kontrolle: 20  $\mu$ l K562-Zellen + 180  $\mu$ l Medium pro *well* (5 *wells*)
- 5 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C
- 2-mal mit FACS-Puffer waschen, 400xg 5 Min.
- Lebend-Tot-Färbung mit ARD (siehe 2.2.7.)

### Auswertung

Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der Auswertesoftware FACS-Diva von Becton Dickinson GmbH. In der Darstellung von zweidimensionalen Dot- und Konturplots erfolgte die Bestimmung der CFSE<sup>+</sup> Population und deren Aufteilung in lebende und tote Zellen, sowohl der Testansätze mit K562-Zellen und NK Zellen als auch der K562-Monokulturen als Kontrollgruppe [*Gating*strategie ähnlich des Isotyps 1b in Abbildung 6: 1. *Gating* der CFSE<sup>+</sup> Population, 2. *Gating* der ARD<sup>+</sup> (tote Zellen, Lysierte Zellen (%) zur Berechnung verwendet) und ARD<sup>-</sup> (lebende Zellen) Populationen]. Aus der Gesamtheit der Messdaten konnte die spezifische Zytotoxizität der NK Zellen wie folgt berechnet werden:

*Spezifische Zytotoxizität (%)*

$$= \frac{\text{Lyse der Zielzellen (\%)} - \text{Spontanlyse (\%)}}{\text{Maximallyse (\%)}^* - \text{Spontanlyse (\%)}} * 100\%$$

\*entspricht 100 %

### 2.2.10 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mittels Excel (Microsoft). Es wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichungen (SD), T-Test's und Effektgrößen berechnet.

#### **Die Effektgröße**

Die Effektgröße nach Cohen ist ein statistisches Maß, um die Größe eines Effektes zu ermitteln und zu verifizieren, ob der Effekt signifikant ist (Cohen 1988). Ergebnisse um 0,2 stehen für einen kleinen Effekt, Ergebnisse um 0,8 zeigen einen großen Effekt an. Die Effektgröße wird folgendermaßen berechnet (MW=Mittelwert, SD=Standardabweichung):

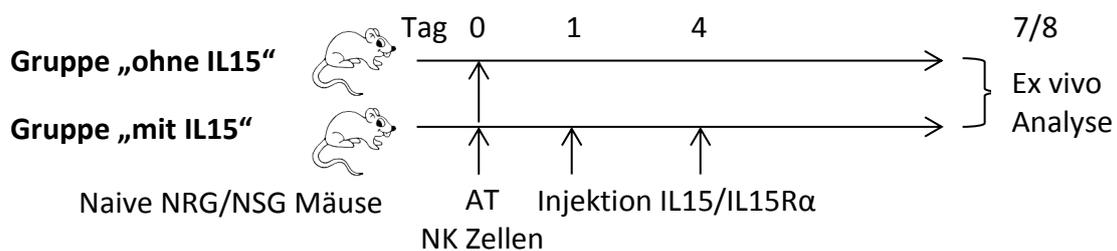
$$\text{Effektgröße } [ ] = \frac{\text{MW der Gruppe (\%)} - \text{MW der Kontrollgruppe (\%)}}{\text{SD der Daten beider Gruppen (\%)}}$$

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Hat die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls einen Effekt auf die NK Zell-Frequenzen nach adoptivem Transfer humaner NK Zellen in NRG bzw. NSG Mäuse?

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, ob sich der Phänotyp humaner NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse erhalten lässt und welche Rolle dabei Zytokine wie IL15 oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls spielen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden humane NK Zellen adoptiv in NRG bzw. NSG Mäuse transferiert. Je nach Verfügbarkeit wurden hierzu NRG bzw. NSG Mäuse genutzt, welche sich nach jetzigem Kenntnisstand nicht im Ausmaß ihrer Immunpermissivität unterscheiden.

Zuerst untersuchten wir den Effekt einer IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Gabe auf die NK Zell-Frequenzen nach adoptivem Transfer. Dazu wurde an Tag 1 und 4 humanes IL15, in Komplexierung mit seinem Rezeptor IL15R $\alpha$ , injiziert (Abbildung 7). Die NK Zell-Frequenzen wurden an Tag 7 bzw. 8 mittels Durchflusszytometrie in Milzproben von injizierten bzw. nicht-injizierten Kontrollmäusen quantifiziert.



**Abbildung 7: Versuchsaufbau der adoptiven Transfer-Experimente ohne bzw. mit IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation.**

In der IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex supplementierten Gruppe von Mäusen zeigten sich deutlich höhere CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen (Gruppe „ohne IL15“: Mittelwert 0,19 %  $\pm$  0,21, Gruppe „mit IL15“: Mittelwert 0,72 %  $\pm$  0,37, Tabelle 9 und Abbildung 9). Dieser

Unterschied ließ sich auch bei Berechnung der zur Kontrollgruppe normierten NK Zell-Frequenz darstellen (Mittelwert:  $8,98 \pm 7,39$ ).

**Tabelle 9: Darstellung des Effektes einer IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Gabe auf die Frequenzen „humaner“ ARD $^{-}$ CD56 $^{+}$  NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse.** Dargestellt sind die Untersuchungen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

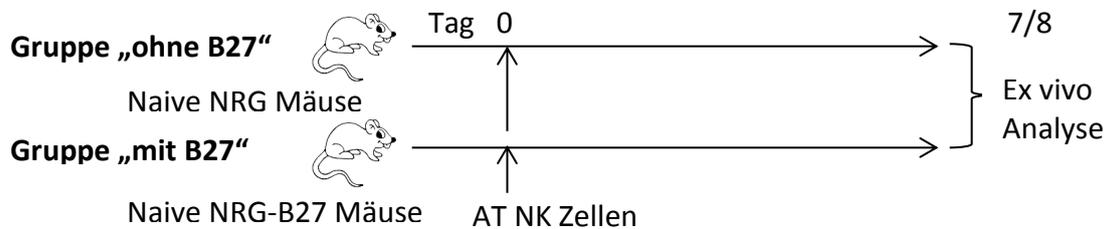
	Maus-Nr.	ARD $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK Zell-Frequenz (%)	MW der Kontrollgruppe	Maus-Nr.	ARD $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK Zell-Frequenz (%)	Normierte ARD $^{-}$ CD56 $^{+}$ NK Zell-Frequenz [ ]*
	ohne IL15			mit IL15		IL15
<b>Spender 2 (NRG)</b>	398	0,37	<b>0,42</b>	414	0,79	1,98
	370	0,28		415	1,20	2,86
	413	0,60		421	4,50 <sup>A</sup>	10,74 <sup>A</sup>
<b>Spender 3 (NSG)</b>	429	0,02	<b>0,05</b>	433	0,07 <sup>A</sup>	1,33 <sup>A</sup>
	430	0,06		434	0,77	15,66
	82	0,06		81	0,98	20,07
<b>Spender 4 (NRG)</b>	615	0,02	<b>0,04</b>	621	0,37	8,62
	560	0,06		563	0,20	4,75
<b>MW <math>\pm</math> SD**</b>		0,19 $\pm$ 0,21			0,72 $\pm$ 0,37	8,98 $\pm$ 7,39

<sup>A</sup> Ausreißer, werden bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen nicht berücksichtigt. Die Datentabellen, Berechnungen und Diagramme mit den vollständigen Daten, welche die Ausreißer mit einbeziehen, finden sich im Anhang.

\* ARD $^{-}$ CD56 $^{+}$  NK Zell-Frequenzen der Gruppe „mit IL15“ geteilt durch den MW der Datenpunkte der Kontrollgruppe (fett gedruckt) des entsprechenden Spenders (Bsp.: normierter Wert Maus 414:  $1,98=0,79/0,42$ )

\*\* MW bzw. SD aller ARD $^{-}$ CD56 $^{+}$  NK Zell-Frequenzen der entsprechenden experimentellen Gruppe bzw. der normierten Einzeldaten (gleiche Spalte, siehe oben), Berechnung ohne der mit <sup>A</sup> gekennzeichneten „Ausreißer“

Zusätzlich zu dem Effekt einer IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Gabe wurde der Einfluss der Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens beispielhaft für menschliche MHC-Moleküle untersucht (Abbildung 8). Die Analyse der NK Zell-Frequenzen mittels Durchflusszytometrie erfolgte an Tag 7 bzw. 8.



**Abbildung 8: Versuchsaufbau der adoptiven Transfer-Experimente ohne bzw. mit Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens.**

**Tabelle 10: Darstellung der Frequenzen „humaner“ ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NRG-B27 Mäuse.** Dargestellt sind die Untersuchungen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

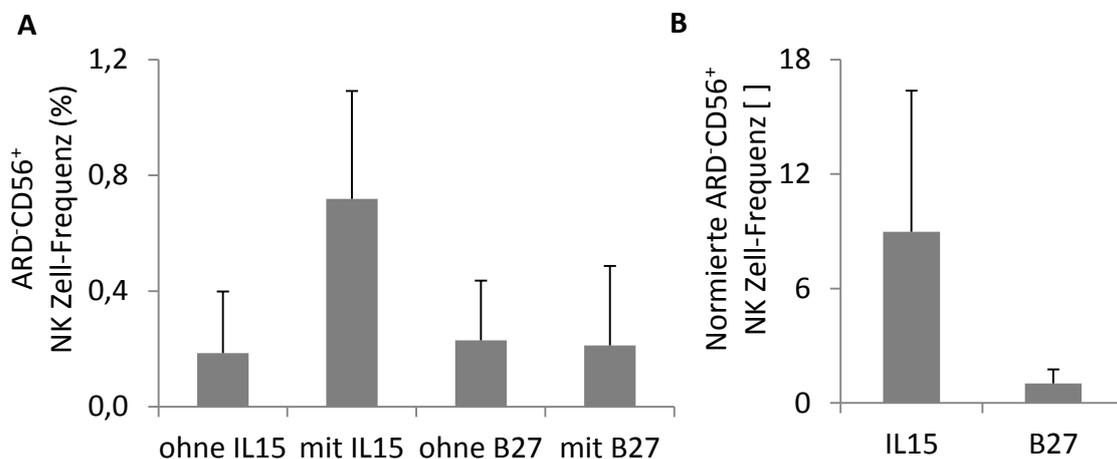
	Maus-Nr.	ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	MW der Kontrollgruppe	Maus-Nr.	ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	Normierte ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz [ ]*
	ohne B27			mit B27		B27
<b>Spender 1 (NRG)</b>	342	0,08	<b>0,13</b>	341	0,06	0,48
	391	0,19		390	0,05	0,4
	nicht erhoben			369	0,67 <sup>A</sup>	5,03 <sup>A</sup>
<b>Spender 2 (NRG)</b>	398	0,37	<b>0,42</b>	399	0,80	1,92
	370	0,28		371	0,30	0,72
	413	0,60		372	0,12	0,28
<b>Spender 4 (NRG)</b>	615	0,02	<b>0,04</b>	616	0,09	2,11
	560	0,06		617	0,05	1,25
<b>MW ± SD**</b>		0,23 ± 0,21			0,21 ± 0,27	1,02 ± 0,75

<sup>A</sup> Ausreißer, werden bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen nicht berücksichtigt. Die Datentabellen, Berechnungen und Diagramme mit den vollständigen Daten, welche die Ausreißer mit einbeziehen, finden sich im Anhang.

\*  $ARD^+CD56^+$  NK Zell-frequenzen der Gruppe „mit B27“ geteilt durch MW der Datenpunkte der Kontrollgruppe (fett gedruckt) des entsprechenden Spenders (Bsp.: normierter Wert Maus 341:  $0,48=0,06/0,13$ )

\*\* MW bzw. SD aller  $ARD^+CD56^+$  NK Zell-Frequenzen der entsprechenden experimentellen Gruppe bzw. der normierten Einzeldaten (gleiche Spalte, siehe oben), Berechnung ohne der mit <sup>A</sup> gekennzeichneten „Ausreißer“

In der Gruppe mit MHC-B27-Transgen zeigte sich kein Unterschied der  $CD56^+$  NK Zell-Frequenzen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Gruppe „ohne B27“: Mittelwert  $0,23 \% \pm 0,21$ , Gruppe „mit B27“: Mittelwert  $0,21 \% \pm 0,27$ , Tabelle 10 und Abbildung 9). Dergleichen ließ sich auch bei Berechnung der normierten NK Zell-Frequenz darstellen (Mittelwert:  $1,02 \pm 0,75$ ).



**Abbildung 9: Die Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens erhöht die NK Zell-Frequenzen in adoptiv transferierten NRG bzw. NSG Mäusen.** Darstellung der Frequenzen der  $ARD^+CD56^+$  NK Zellen nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäusen wahlweise ohne oder mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex bzw. ohne oder in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens. (A) Mittelwerte der  $ARD^+CD56^+$  NK Zell-Frequenzen (%). (B) Mittelwerte der normierten  $ARD^+CD56^+$  NK Zell-Frequenzen. Dargestellt sind zusammenfassend die Analysedaten an Tag 7 bzw. 8 mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten ohne Ausreißer (mit <sup>A</sup> markiert, siehe Tabelle 9 und Tabelle 10). Es handelt sich um 4 unabhängige Experimente mit je n=8 Mäusen ohne bzw. mit IL15/IL15R $\alpha$ -Supplementation und n=7 Mäusen ohne bzw. n=8 Mäusen mit MHC-B27-Transgen.

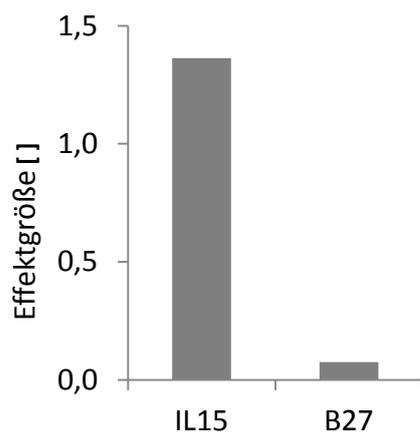
Letztlich zeigt die Berechnung der Effektgröße nach Cohen für die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex einen deutlichen Effekt (Effektgröße: 1,36, siehe Tabelle 11 und Abbildung 10). Im Gegensatz dazu zeigte die Berechnung für die Gegenwart des

humanen MHC-B27-Transgens keinen Effekt (Effektgröße: 0,08). Wir schließen daraus, dass die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex einen positiven Effekt auf die NK Zell-Frequenz hat, nicht aber die Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens.

**Tabelle 11: Berechnung der Effektgröße (Formel siehe 2.2.9)\***

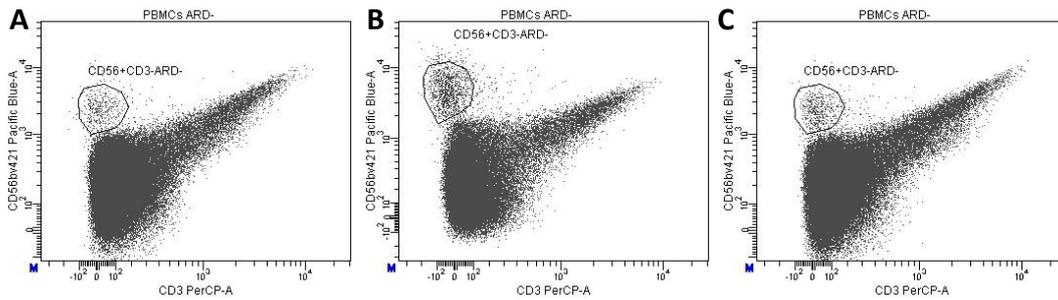
MW ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	Spender 2, 3, 4		Spender 1, 2, 4	
	ohne IL15	mit IL15	ohne B27	mit B27
	0,19	0,72	0,23	0,21
SD alle Werte Gruppe und Kontrollgruppe (%)	0,39		0,23	
Effektgröße [ ]	IL15	1,36	B27	0,08

\* ohne Ausreißer (in Tabelle 9 und 10 mit <sup>A</sup> markiert)



**Abbildung 10: Die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex erhöht die NK Zell-Frequenzen in adoptiv transferierten NRG bzw. NSG Mäusen.** Darstellung der Effektgröße der Supplementation von IL15 bzw. der Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens auf die ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen in NRG bzw. NSG Mäusen (Tabelle 11). Es handelt sich um 4 unabhängige Experimente mit je n=8 Mäusen ohne bzw. mit IL15/IL15R $\alpha$ -Supplementation und n=7 Mäusen ohne bzw. n=8 Mäusen mit MHC-B27- Transgen.

Der Effekt der IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation auf die NK Zell-Frequenz ist ebenso in der Darstellung der Dotplots beobachtbar (Abbildung 11). Dabei zeigte sich bei gleicher angezeigter Eventzahl für die Gruppe mit IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation (dargestellt beispielhaft Mausnummer 415) eine deutlich größere Population im Vergleich zu den Gruppen ohne IL15/IL15R $\alpha$ -Supplementation bzw. mit MHC-B27-Transgen (dargestellt beispielhaft Mausnummer 370 bzw. 371).



**Abbildung 11: Die Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex erhöht die NK Zell-Frequenzen in adoptiv transferierten NRG bzw. NSG Mäusen.** Dargestellt sind die ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> Populationen im Dotplot CD56 gegen CD3 bei je 500 000 Dots. (A) NRG ohne IL15 (Mausnr. 370). (B) NRG mit IL15 (Mausnr. 415). (C) NRG mit humanem MHC-B27-Transgen (Mausnr. 371).

### 3.2 Wie verhalten sich die Frequenzen der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse?

Im nächsten Schritt wurde untersucht, wie sich die Frequenzen der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse verhalten. Hierzu wurde durchflusszytometrisch die Frequenz der CD16<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> Population als CD56<sup>bright</sup> und der CD16<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Population als CD56<sup>dim</sup> an NK Zellen bestimmt.

**Tabelle 12: Frequenz der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse.** Dargestellt sind die Untersuchungen, welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

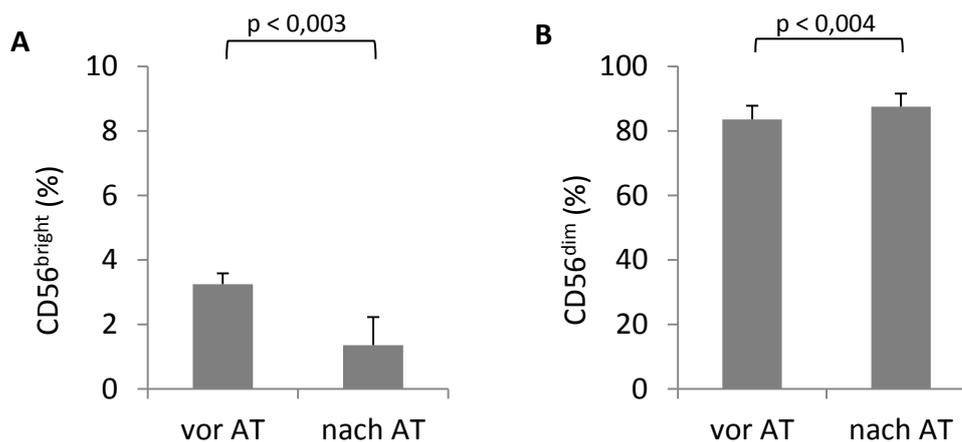
Frequenz (%)	vor AT		nach AT		Maus-Nr.	CD56 bright	CD56 dim	Maus-Nr.	CD56 bright	CD56 dim
					ohne IL15			mit IL15		
Spender 2 (NRG)	3,5	88,2			398	1,2	95,9	414	0,3	95,0
					370	1,6	93,2	415	0,4	96,2
					413	1,7	96,3	421	0,2	96,5
Spender 3 (NSG)	3,4	79,9			429	2,7	86,6	433	1,7	85,5
					430	2,2	89,5	434	0,9	95,1
					82	6,3 <sup>A</sup>	70,8 <sup>A</sup>	81	0,5	93,6
				ohne B27			mit B27			
Spender 1 (NRG)	2,9	82,6			342	1,4	92,5	341	2,2	89,0
					391	0,8	95,0	390	1,1	82,7
					nicht erhoben			369	3,6	89,4
Spender 2 (NRG)	3,5	88,2			398	1,2	95,9	399	1,8	95,1
					370	1,6	93,2	371	1,0	93,2
					413	1,7	96,3	372	1,8	89,8

<sup>A</sup> Ausreißer, werden bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen nicht berücksichtigt. Die Datentabellen, Berechnungen und Diagramme mit den vollständigen Daten, welche die Ausreißer mit einbeziehen, finden sich im Anhang.

**Tabelle 13: Die Mittelwerte der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Frequenzen unterscheiden sich vor und nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), die aus den Werten aus Tabelle 12 berechnet wurden.**

Frequenz (%)	CD56 bright		CD56 dim		CD56 bright		CD56 dim	
	Gesamt	vor AT		nach AT	ohne IL15		mit IL15	
MW ± SD*		3,2 ± 0,3	83,6 ± 4,2		1,9 ± 0,6	92,3 ± 4,2	0,7 ± 0,6	93,6 ± 4,1
		nach AT			ohne B27		mit B27	
MW ± SD*		1,4 ± 0,9	92,1 ± 4,1		1,3 ± 0,4	94,6 ± 1,7	1,9 ± 0,9	89,9 ± 4,2

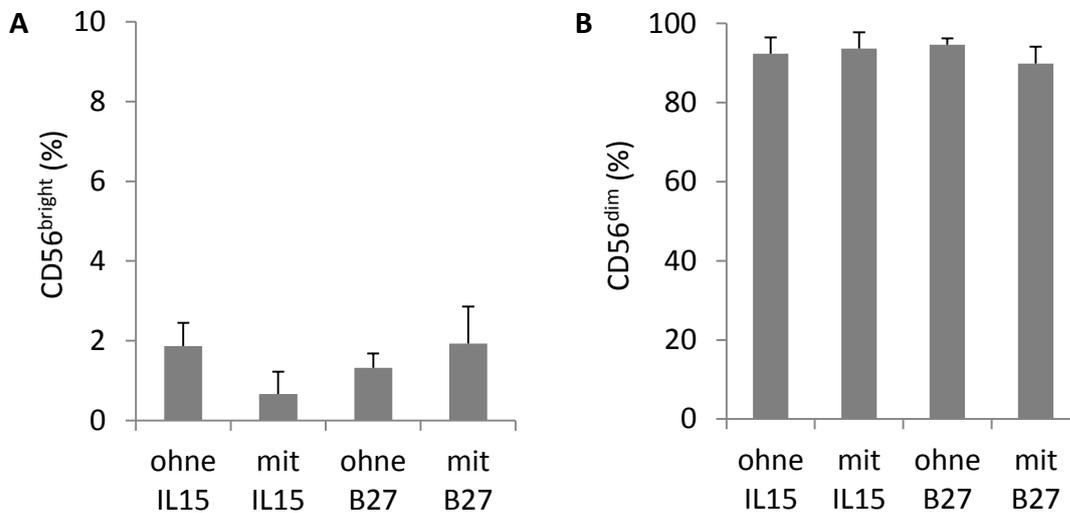
\* MW bzw. SD der Frequenzen an CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach AT, Berechnung ohne der mit <sup>A</sup> gekennzeichneten „Ausreißer“ in Tabelle 12.



**Abbildung 12: Die Frequenzen der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>di</sup> Subpopulationen unterscheiden sich vor und nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse.** Darstellung der Frequenzen der (A) CD56<sup>bright</sup> und (B) CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen der humanen Proben vor AT an d0 und nach adoptivem Transfer aus den Mäusen an Tag 7 bzw. 8. Dargestellt sind die Analysedaten mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten ohne Ausreißer (mit <sup>A</sup> markiert, Tabelle 12 und 13). Es handelt sich um 3 unabhängige Experimente mit n=3 humanen Proben vor AT und n=19 Datenpunkten nach AT.

Vor AT zeigten sich deutlich höhere CD56<sup>bright</sup> Frequenzen als nach AT (Gruppe „vor AT“: Mittelwert 3,2 % ± 0,3, Gruppe „nach AT“: Mittelwert 1,4 % ± 0,9, p < 0,003, Tabelle 13 und Abbildung 12). Analog dazu waren die Frequenzen der CD56<sup>dim</sup>

Subpopulation vor AT deutlich niedriger als nach AT (Gruppe „vor AT“: Mittelwert 83,6 %  $\pm$  4,2, Gruppe „nach AT“: Mittelwert 92,1 %  $\pm$  4,1,  $p < 0,004$ ).



**Abbildung 13: Der Anteil an CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen unterscheidet sich nach adoptivem Transfer nicht signifikant in den verschiedenen Mausgruppen.** Darstellung der Frequenzen der (A) CD56<sup>bright</sup> und (B) CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse wahlweise ohne oder mit Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex bzw. ohne oder in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens. Dargestellt sind die Analysedaten mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten ohne Ausreißer (mit <sup>A</sup> markiert, siehe Tabelle 12 und 13). Es handelt sich um 3 unabhängige Experimente mit n=5 Mäusen ohne bzw. n=6 Mäusen mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation und n=5 Mäusen ohne bzw. n=6 Mäusen mit MHC-B27-Transgen.

Beim Vergleich der verschiedenen Gruppen – „ohne IL15“, „mit IL15“, „ohne B27“ und „mit B27“ – zeigten sich keine signifikanten Unterschiede für die CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Frequenzen (CD56<sup>bright</sup>: Gruppe „ohne IL15“: Mittelwert 1,9 %  $\pm$  0,6, Gruppe „mit IL15“: Mittelwert 0,7 %  $\pm$  0,6, Gruppe „ohne B27“: Mittelwert 1,3 %  $\pm$  0,4, Gruppe „mit B27“: Mittelwert 1,9 %  $\pm$  0,9, CD56<sup>dim</sup>: Gruppe „ohne IL15“: Mittelwert 92,3 %  $\pm$  4,2, Gruppe „mit IL15“: Mittelwert 93,6 %  $\pm$  4,1, Gruppe „ohne B27“: Mittelwert 94,6 %  $\pm$  1,7, Gruppe „mit B27“: Mittelwert 89,9 %  $\pm$  4,2, Tabelle 13 und Abbildung 13). Lediglich zeigte sich eine vergleichsweise geringe Größe der CD56<sup>bright</sup> Population in der Gruppe „mit IL15“ im Vergleich zur Kontrollgruppe „ohne IL15“.

### **3.3 Hat die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls einen Effekt auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse?**

Im Weiteren untersuchten wir den Phänotyp humaner NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse unter dem Einfluss des Zytokins IL15 bzw. der Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls. Dabei betrachteten wir die Expression der inhibierenden KIRs und des NKG2A-Rezeptors und der aktivierenden NK Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp44. Die Bestimmung der Rezeptor-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie an Tag 0 (vor AT) und an Tag 7 bzw. 8 in Milzproben der NRG bzw. NSG Mäuse (nach AT).

In Tabelle 14 und Tabelle 15 kommen die Primärdaten der Rezeptor-Expressionen vor und nach AT zur Darstellung. In den folgenden Tabellen Tabelle 16 und Tabelle 17 ist die zur Kontrolle vor AT normierte NK Zell-Rezeptor-Expression der Proben nach AT wiedergegeben. Die Mittelwerte dieser normierten Expression für die verschiedenen Gruppen „ohne IL15“, „mit IL15“, „ohne B27“ und „mit B27“ sind in Tabelle 19 und Abbildung 15 (A) und (B) dargestellt.

Um den Effekt der Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls genauer zu bestimmen, berechneten wir die NK Zell-Rezeptor-Expression der Versuchsgruppen „mit IL15“ und „mit B27“ normiert zur Kontrollgruppe „ohne IL15“ bzw. „ohne B27“. Dazu bestimmten wir die Mittelwerte der Rezeptor-Expression der Kontrollgruppen „ohne IL15“ und „ohne B27“ (Tabelle 20). So konnten wir im nächsten Schritt die Rezeptor-Expression der Proben mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex normiert zur Kontrollgruppe „ohne IL15“ (Tabelle 21) und die Rezeptor-Expression der Proben in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens normiert zur Kontrolle „ohne B27“ (Tabelle 22) berechnen (Abbildung 15 (C)).

**Tabelle 14: Darstellung des Effektes der Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse – Primärdaten.** Dargestellt sind die Primärdaten der Untersuchungen der humanen NK Zellen vor und nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse wahlweise ohne bzw. mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex, welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

Rezeptor-Expression (%)	vor AT	nach AT					
		ohne IL15			mit IL15		
<b>Spender 2</b>							
Maus-Nr. (NRG)	-	398	370	413	414	415	421
KIR <sup>+</sup>	45	65,8	61,2	68,6	45,8	48,7	48,6
NKG2A <sup>+</sup>	38,4	27,1	28,9	27,7	39,3	39,4	39,5
NKG2D <sup>+</sup>	92,7	94,7	93,7	98	96,6	96,4	96,6
NKp44 <sup>+</sup>	0,6	0	0,8	0	0,3	0,2	0,1
<b>Spender 3</b>							
Maus-Nr. (NSG)	-	429	430	82	433	434	81
KIR <sup>+</sup>	40,2	35,7	50	29,2 <sup>A</sup>	37,8	41,7	46
NKG2A <sup>+</sup>	54,4	46,4	39	52,1 <sup>A</sup>	49,3	56,2	54,5
NKG2D <sup>+</sup>	93,9	88,7	91,4	80 <sup>A</sup>	76,9	95,7	97,1
NKp44 <sup>+</sup>	0,9	0	0	0 <sup>A</sup>	2,1	0,2	0,1
<b>Spender 4</b>							
Maus-Nr. (NRG)	-	615	560	nicht erhoben	621	563	nicht erhoben
KIR <sup>+</sup>	53,4	59,7	53,8		48,9	60,7	
NKG2A <sup>+</sup>	43,3	39,1	55,2		52,1	56,7	
NKG2D <sup>+</sup>	72	50,5	73,6		79,7	91,3	
NKp44 <sup>+</sup>	1,3	26,3	4,3		2,2	2,5	

<sup>A</sup> Bei Maus-Nr. 82 ließen sich nur sehr wenige NK Zellen detektieren, daher werden diese mit <sup>A</sup> markierten Daten bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen nicht berücksichtigt. Die Datentabellen, Berechnungen und Diagramme mit den vollständigen Daten, welche die Daten der Maus-Nr. 82 mit einbeziehen, finden sich im Anhang.

**Tabelle 15: Die Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens hat keinen Effekt auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG Mäuse – Primärdaten.** Dargestellt sind die Primärdaten der Untersuchungen der humanen NK Zellen vor und nach AT in NRG Mäuse wahlweise ohne bzw. in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens, welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

Rezeptor-Expression (%)	vor AT	nach AT					
		ohne B27			mit B27		
<b>Spender 1</b>							
Maus-Nr. (NRG)	-	342	391	nicht erhoben	341	390	369
KIR <sup>+</sup>	56,6	57,2	62,2		59,8	59,4	55,1
NKG2A <sup>+</sup>	21,5	33,9	28,1		24,4	19,9	32,4
NKG2D <sup>+</sup>	88,2	90,5	98,5		81,7	85,7	98,1
NKp44 <sup>+</sup>	1,6	1,8	1		4,6	0,9	0,1
<b>Spender 2</b>							
Maus-Nr. (NRG)	-	398	370	413	399	371	372
KIR <sup>+</sup>	45	65,8	61,2	68,6	62,4	59,4	63
NKG2A <sup>+</sup>	38,4	27,1	28,9	27,7	26,8	24,1	33,1
NKG2D <sup>+</sup>	92,7	94,7	93,7	98	94,4	91,6	94,8
NKp44 <sup>+</sup>	0,6	0	0,8	0	0,1	0,3	0,1
<b>Spender 4</b>							
Maus-Nr. (NRG)	-	615	560	nicht erhoben	616	617	nicht erhoben
KIR <sup>+</sup>	53,4	59,7	53,8		61,1	49	
NKG2A <sup>+</sup>	43,3	39,1	55,2		55,6	51,8	
NKG2D <sup>+</sup>	72	50,5	73,6		72,7	68	
NKp44 <sup>+</sup>	1,3	26,3	4,3		8	9,8	

**Tabelle 16: Darstellung des Effektes der Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse – Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT.** Dargestellt sind die zur Kontrolle vor AT normierten NK Zell-Rezeptor-Expressionen der Proben nach AT, welche aus den Werten aus Tabelle 14 berechnet wurden. Diese wurden an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben.

Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT [ ]*		ohne IL15			mit IL15		
Spender 2	Maus-Nr. (NRG)	398	370	413	414	415	421
	KIR <sup>+</sup>	1,5	1,4	1,5	1,0	1,1	1,1
	NKG2A <sup>+</sup>	0,7	0,8	0,7	1,0	1,0	1,0
	NKG2D <sup>+</sup>	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0
	NKp44 <sup>+</sup>	0,0	1,3	0,0	0,5	0,3	0,2
Spender 3	Maus-Nr. (NSG)	429	430	82	433	434	81
	KIR <sup>+</sup>	0,9	1,2	0,7 <sup>A</sup>	0,9	1,0	1,1
	NKG2A <sup>+</sup>	0,9	0,7	1,0 <sup>A</sup>	0,9	1,0	1,0
	NKG2D <sup>+</sup>	0,9	1,0	0,9 <sup>A</sup>	0,8	1,0	1,0
	NKp44 <sup>+</sup>	0,0	0,0	0,0 <sup>A</sup>	2,3	0,2	0,1
Spender 4	Maus-Nr. (NRG)	615	560	nicht erhoben	621	563	nicht erhoben
	KIR <sup>+</sup>	1,1	1,0		0,9	1,1	
	NKG2A <sup>+</sup>	0,9	1,3		1,2	1,3	
	NKG2D <sup>+</sup>	0,7	1,0		1,1	1,3	
	NKp44 <sup>+</sup>	20,2	3,3		1,7	1,9	

\* Rezeptor-Expression der Datenpunkte nach AT aus Tabelle 14 geteilt durch den Kontrollwert der Proben vor AT des entsprechenden Spenders aus Tabelle 14 (Bsp.: normierter Wert Maus 398:  $1,5=65,8/45$ )

<sup>A</sup> Bei Maus Nr. 82 ließen sich nur sehr wenige NK Zellen detektieren, daher werden diese mit <sup>A</sup> markierten Daten bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen nicht berücksichtigt. Die Datentabellen, Berechnungen und Diagramme mit den vollständigen Daten, welche die Daten der Maus-Nr. 82 mit einbeziehen, finden sich im Anhang.

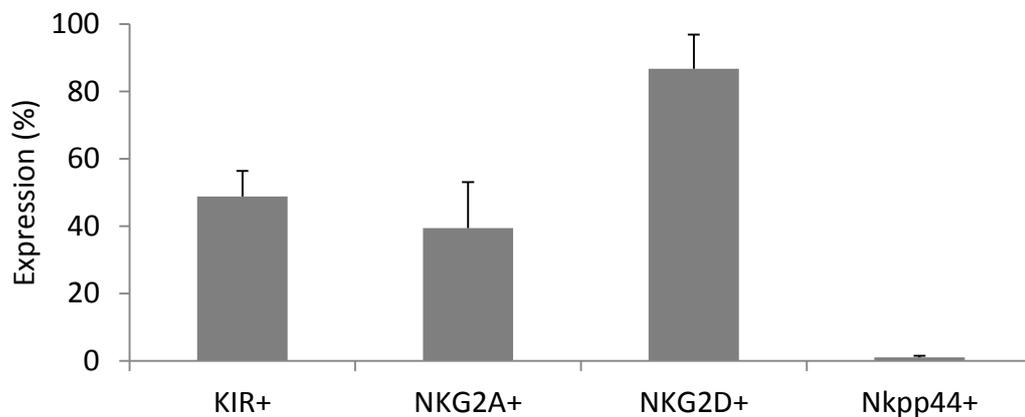
**Tabelle 17: Die Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens hat keinen Effekt auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG Mäuse – Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT.** Dargestellt sind die zur Kontrolle vor AT normierten NK Zell-Rezeptor-Expressionen der Proben nach AT, welche aus den Werten aus Tabelle 15 berechnet wurden. Diese wurden an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben.

Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT [ ]*		ohne B27			mit B27		
Spender 1	Maus-Nr. (NRG)	342	391	nicht erhoben	341	390	369
	KIR <sup>+</sup>	1,0	1,1		1,1	1,0	1,0
	NKG2A <sup>+</sup>	1,6	1,3		1,1	0,9	1,5
	NKG2D <sup>+</sup>	1,0	1,1		0,9	1,0	1,1
	NKp44 <sup>+</sup>	1,1	0,6		2,9	0,6	0,1
Spender 2	Maus-Nr. (NRG)	398	370	413	399	371	372
	KIR <sup>+</sup>	1,5	1,4	1,5	1,4	1,3	1,4
	NKG2A <sup>+</sup>	0,7	0,8	0,7	0,7	0,6	0,9
	NKG2D <sup>+</sup>	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	1,0
	NKp44 <sup>+</sup>	0,0	1,3	0,0	0,2	0,5	0,2
Spender 4	Maus-Nr. (NRG)	615	560	nicht erhoben	616	617	nicht erhoben
	KIR <sup>+</sup>	1,1	1,0		1,1	0,9	
	NKG2A <sup>+</sup>	0,9	1,3		1,3	1,2	
	NKG2D <sup>+</sup>	1,0	1,1		1,0	0,9	
	NKp44 <sup>+</sup>	20,2	3,3		6,2	7,5	

\* Rezeptor-Expression der Datenpunkte nach AT aus Tabelle 15 geteilt durch den Kontrollwert der Proben vor AT des entsprechenden Spenders aus Tabelle 15 (Bsp.: normierter Wert Maus 342:  $1,0=57,2/56,6$ )

**Tabelle 18: Darstellung der Mittelwerte der Expressionen der NK Zell-Rezeptoren der humanen NK Zellen vor AT.** Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), die aus den Werten aus Tabelle 14 und 15 berechnet wurden.

Rezeptor-Expression (%)	vor AT			
	KIR <sup>+</sup>	NKG2A <sup>+</sup>	NKG2D <sup>+</sup>	NKp44 <sup>+</sup>
MW ± SD	48,8 ± 7,5	39,4 ± 13,7	86,7 ± 10,1	1,1 ± 0,4



**Abbildung 14: Expression der NK Zell-Rezeptoren auf humanen NK Zellen vor AT.** Darstellung der Expression der inhibierenden KIRs und des NKG2A-, NKG2D- und NKp44-Rezeptoren (%) auf humanen NK-Zellen. Dargestellt sind zusammenfassend die Analysedaten der humanen Proben vor adoptivem Transfer mit Mittelwerten und Standardabweichungen (siehe Tabelle 18). Es handelt sich um vier unabhängige Experimente mit vier Spendern.

Um später Rückschlüsse auf Veränderungen des Phänotyps der NK Zellen nach AT in ein murines Xenotransplantationsmodell ziehen zu können, sollen zunächst die Ergebnisse der Rezeptor-Expressionen vor AT betrachtet werden. Für die Expression der NK Zell-Rezeptoren auf den humanen NK Zellen vor AT ergaben sich die in Tabelle 18 und Abbildung 14 dargestellten Mittelwerte und Standardabweichungen. Es zeigte sich für die KIRs ein Mittelwert von 48,8 % ± 7,5, für den NKG2A-Rezeptor von 39,4 % ± 13,7, den NKG2D-Rezeptor von 86,7 % ± 10,1 und den NKp44-Rezeptor von 1,1 % ± 0,4.

**Tabelle 19: Darstellung der Mittelwerte der Expressionen der NK Zell-Rezeptoren der Proben nach AT normiert zur Kontrolle vor AT.** Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), die aus den zur Kontrolle vor AT normierten Daten nach AT aus Tabelle 16 und 17 berechnet wurden.

		Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT [ ]			
		ohne IL15	mit IL15	ohne B27	mit B27
MW ± SD*	KIR <sup>+</sup>	1,23 ± 0,24	1,04 ± 0,08	1,23 ± 0,22	1,16 ± 0,19
	NKG2A <sup>+</sup>	0,85 ± 0,20	1,07 ± 0,13	1,03 ± 0,35	1,03 ± 0,3
	NKG2D <sup>+</sup>	0,96 ± 0,12	1,05 ± 0,12	0,99 ± 0,13	1,0 ± 0,06
	NKp44 <sup>+</sup>	3,55 ± 7,46	0,91 ± 0,91	3,80 ± 7,33	2,25 ± 3,0

\* MW bzw. SD der NK Zell-Rezeptor-Expressionen nach AT normiert zur Kontrolle vor AT, Berechnung ohne der mit <sup>A</sup> gekennzeichneten Daten von Maus-Nr. 82 in Tabelle 16.

**Tabelle 20: Darstellung der Mittelwerte der NK Zell-Rezeptor-Expression der Kontrollgruppen ohne Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex bzw. ohne MHC-B27-Transgen.** Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Datenpunkte ohne IL15 bzw. ohne MHC-B27-Transgen aus Tabelle 14 bzw. 15. Diese wurden an 4 Spendern in 4 verschiedenen Experimenten erhoben.

MW der Rezeptor-Expression (%)*	ohne IL15			ohne B27		
	Spender 2 (NRG)	Spender 3 (NSG)	Spender 4 (NRG)	Spender 1 (NRG)	Spender 2 (NRG)	Spender 4 (NRG)
KIR <sup>+</sup>	65,2	42,9	56,8	59,7	65,2	56,8
NKG2A <sup>+</sup>	27,9	42,7	47,2	31,0	27,9	47,2
NKG2D <sup>+</sup>	95,5	95,5	62,1	94,5	95,5	62,1
NKp44 <sup>+</sup>	0,3	0,0	15,3	1,4	0,3	15,3

\* MW der NK Zell-Rezeptor-Expressionen der Kontrollgruppen nach AT, Berechnung ohne der mit <sup>A</sup> gekennzeichneten Daten von Maus-Nr. 82 in Tabelle 14.

**Tabelle 21: Darstellung der NK Zell-Rezeptor-Expression der Proben mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex normiert zur Kontrollgruppe.** Dargestellt sind die zur Kontrollgruppe normierten NK Zell-Rezeptor-Expressionen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche aus den Werten aus Tabelle 14 und 20 berechnet wurden. Diese wurden an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben (n.b. – nicht berechenbar).

Gruppe mit IL15	Maus-Nr.	Expression normiert zur Kontrollgruppe ohne IL15 [ ]*			
		KIR <sup>+</sup>	NKG2A <sup>+</sup>	NKG2D <sup>+</sup>	NKp44 <sup>+</sup>
Spender 2 (NRG)	414	0,7	1,4	1,0	1,1
	415	0,7	1,4	1,0	0,8
	421	0,7	1,4	1,0	0,4
Spender 3 (NSG)	433	0,9	1,2	0,9	n.b.
	434	1,0	1,3	1,1	n.b.
	81	1,1	1,3	1,1	n.b.
Spender 4 (NRG)	621	0,9	1,1	1,3	0,1
	563	1,1	1,2	1,5	0,2
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	-	0,88 $\pm$ 0,15	1,29 $\pm$ 0,12	1,10 $\pm$ 0,19	n.b.

\* Rezeptor-Expression der Datenpunkte mit IL15 aus Tabelle 14 geteilt durch den Mittelwert der Proben ohne IL15 des entsprechenden Spenders aus Tabelle 20, der ohne die mit <sup>A</sup> markierten Daten von Maus-Nr. 82 berechnet wurde (Bsp.: normierter Wert Maus 414:  $0,7=45,8/65,2$ ).

In Tabelle 19 und Abbildung 15 (A) und (B) sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der zur Kontrolle vor AT normierten Expressionen der NK Zell-Rezeptoren der Proben nach AT aufgeführt. Für die KIRs zeigt sich nach AT eine geringfügige Hochregulation in den Gruppen „ohne IL15“, „ohne B27“ und „mit B27“ (KIR-Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT: „ohne IL15“  $1,17 \pm 0,28$ , „ohne B27“  $1,23 \pm 0,22$ , „mit B27“  $1,16 \pm 0,19$ ). In der Gruppe mit Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex ist die KIR-Expression nach AT in etwa gleich geblieben (KIR-Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT: „mit IL15“  $1,04 \pm 0,08$ ). Im Vergleich zur Gruppe „ohne IL15“ lässt sich hier ein kleiner Effekt der IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation beobachten (Rezeptor-Expression der Gruppe

„mit IL15“ normiert zur Kontrolle „ohne IL15“:  $0,93 \pm 0,19$ , Tabelle 21 und Abbildung 15 (C)).

**Tabelle 22: Darstellung der NK Zell-Rezeptor-Expression der Proben in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens normiert zur Kontrolle ohne MHC-B27-Transgen.** Dargestellt sind die zur Kontrollgruppe normierten NK Zell-Rezeptor-Expressionen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche aus den Werten aus Tabelle 15 und 20 berechnet wurden. Diese wurden an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben.

Gruppe mit B27	Maus-Nr.	Expression normiert zur Kontrollgruppe ohne B27 [ ]*			
		KIR <sup>+</sup>	NKG2A <sup>+</sup>	NKG2D <sup>+</sup>	NKp44 <sup>+</sup>
Spender 1 (NRG)	341	1,0	0,8	0,9	3,3
	390	1,0	0,6	0,9	0,6
	369	0,9	1,0	1,0	0,1
Spender 2 (NRG)	399	1,0	1,0	1,0	0,4
	371	0,9	0,9	1,0	1,1
	372	1,0	1,2	1,0	0,4
Spender 4 (NRG)	616	1,1	1,2	1,2	0,5
	617	0,9	1,1	1,1	0,6
MW ± SD	-	$0,96 \pm 0,07$	$0,97 \pm 0,19$	$1,0 \pm 0,1$	$0,88 \pm 1,02$

\* Rezeptor-Expression der Datenpunkte mit B27 aus Tabelle 15 geteilt durch den Mittelwert der Proben ohne B27 des entsprechenden Spenders aus Tabelle 20 (Bsp.: normierter Wert Maus 341:  $1,0 = 59,8/59,7$ )

Die inhibitorische KIR-Expression der Gruppe „mit B27“ unterscheidet sich nicht von ihrer Kontrollgruppe. Die zur Kontrolle „ohne B27“ normierte Expression der Gruppe „mit B27“ beträgt  $0,96 \pm 0,07$  (Tabelle 22 und Abbildung 15 (C)).

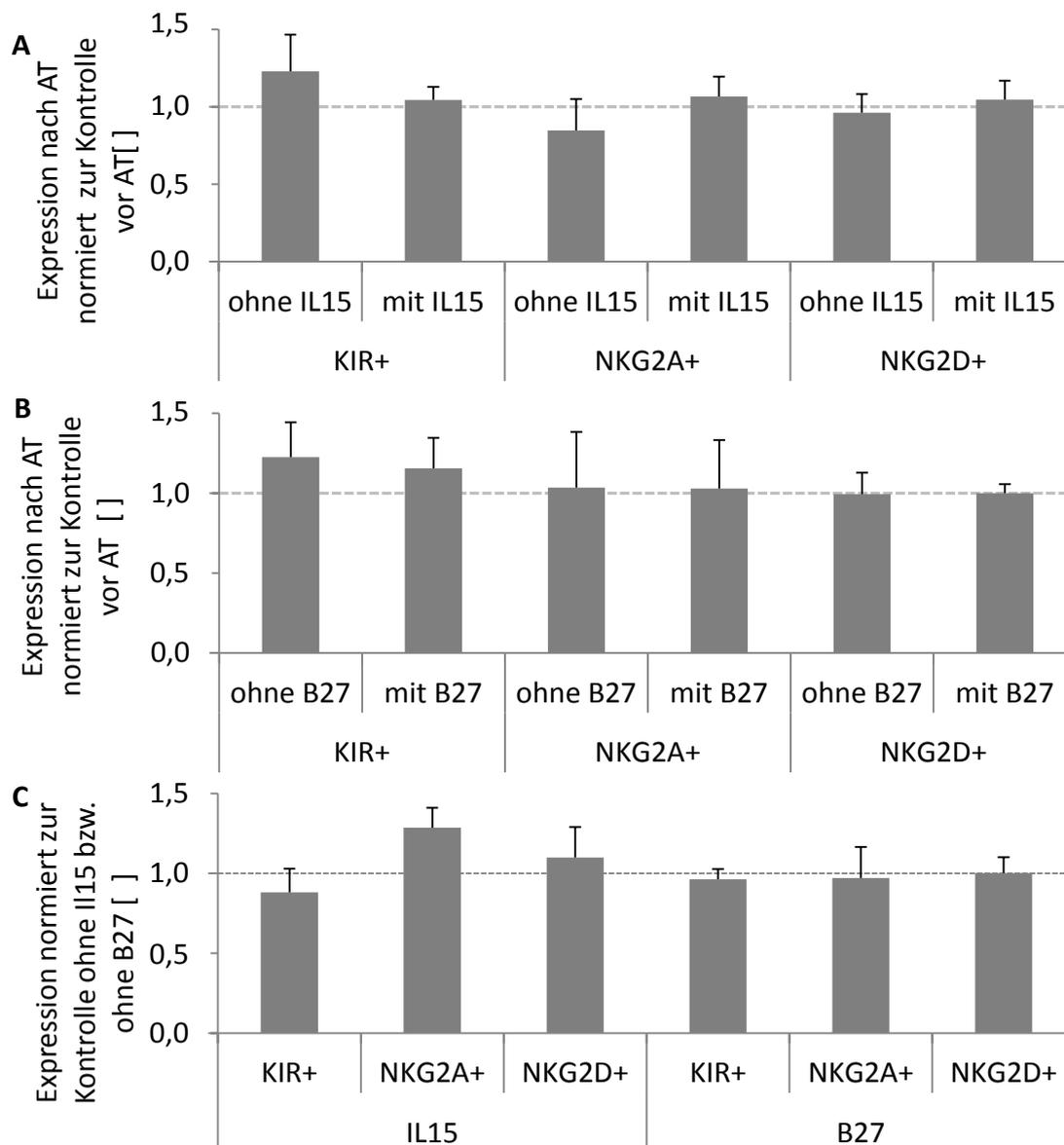
Die Expression der Rezeptoren NKG2A und NKG2D zeigten nach AT kaum eine Veränderung zu vor AT (NKG2A-Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT: „ohne IL15“  $0,86 \pm 0,19$ , „mit IL15“  $1,07 \pm 0,13$ , „ohne B27“  $1,03 \pm 0,35$ , „mit B27“  $1,03 \pm 0,3$ , NKG2D-Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT: „ohne IL15“  $0,95 \pm 0,12$ , „mit IL15“  $1,05 \pm 0,12$ , „ohne B27“  $1,05 \pm 0,12$ , „mit B27“  $1,0 \pm 0,06$ , Tabelle 19 und Abbildung 15 (A) und (B)). Einzig für die Gruppe „ohne IL15“-Supplementation

konnte man bei einem Wert von 0,86 eine Herunterregulierung des NKG2A-Rezeptors und damit auch einen Effekt der IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation beobachten. In der Berechnung der NKG2A-Rezeptor-Expression der Gruppe „mit IL15“ normiert zur Kontrolle „ohne IL15“ zeigt sich ein kleiner Unterschied (NKG2A-Expression Gruppe „mit IL15“ normiert zur Kontrollgruppe „ohne IL15“:  $1,25 \pm 0,14$ , Tabelle 21 und Abbildung 15 (C)). Für die Expression des NKG2D-Rezeptors konnten wir einen kleineren Unterschied zwischen der Gruppe „mit IL15“ und ihrer Kontrolle „ohne IL15“ beobachten (NKG2D-Expression Gruppe „mit IL15“ normiert zur Kontrollgruppe „ohne IL15“:  $1,11 \pm 0,19$ , Tabelle 21 und Abbildung 15 (C)).

Im Gegensatz zur IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation zeigt die Gegenwart eines humanen MHC-B27-Moleküls keinen Effekt auf die NKG2A- und NKG2D-Expression. Hier ergab sich für die Expression der Gruppe „mit B27“ normiert zur Kontrolle „ohne B27“ für den NKG2A-Rezeptor ein Wert von  $0,97 \pm 0,19$  und für den NKG2D-Rezeptor ein Wert von  $1,0 \pm 0,1$  (Tabelle 21 und Abbildung 15 (C)).

Für den NKp44-Rezeptor zeigte sich keine Veränderung zwischen vor und nach AT (NKp44-Rezeptor-Expression bis auf Ausnahmen zwischen 0 und 2 %, Tabelle 14 und Tabelle 15). Aufgrund der geringen Eventzahlen lassen sich keine sinnvollen Aussagen zu einem Effekt durch IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation bzw. der Präsenz des MHC-B27-Transgens treffen, weshalb wir den NKp44-Rezeptor in der näheren Ausführung nicht weiter betrachtet haben.

Zusammenfassend konnten wir daraus schließen, dass die Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens einen kleinen Effekt auf die Expression der KIRs und des NKG2A- und NKG2D-Rezeptors auf humanen NK Zellen nach AT in NRG bzw. NSG Mäusen hat.



**Abbildung 15: Die Supplementation von humanem IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens zeigt einen kleinen Effekt auf die Expression der inhibierenden KIRs und des NKG2A- und NKG2D-Rezeptors auf humanen NK Zellen nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse.** Darstellung ausgewählter NK Zell-Rezeptoren auf NK Zellen nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse, welche wahlweise ohne oder mit IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex supplementiert wurden bzw. wahlweise das humane MHC-B27-Transgen exprimierten. Dargestellt sind die Daten nach AT normiert zur Kontrolle vor AT (A und B) und die Daten mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation bzw. in Gegenwart des MHC-B27-Transgens normiert zur Kontrollgruppe (C). Zusammenfassend sind die Analysedaten an Tag 7 bzw. 8 mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten ohne Ausreißer (mit <sup>A</sup> markiert, siehe Tabelle 19, 21 und 22) dargestellt. Es handelt sich um 4 unabhängige Experimente mit je n=8 Mäusen ohne bzw. mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation und n=7 Mäusen ohne bzw. n=8 Mäusen in Gegenwart des MHC-B27-Transgens.

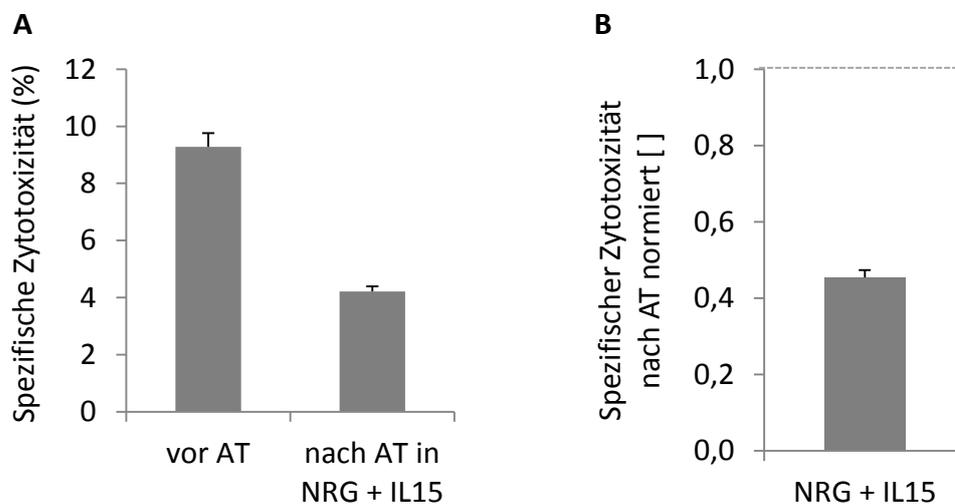
### **3.4 Welche Rolle spielt die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls für die Zytotoxizität von humanen NK Zellen nach AT in NRG Mäuse?**

Im letzten Versuchsteil untersuchten wir die *in vitro* Zytotoxizität humaner NK Zellen gegenüber K562-Zellen. Im Besonderen interessierte uns, inwieweit die spezifische Zytotoxizität nach adoptivem Transfer (AT) in NRG Mäuse erhalten werden kann und welche Rolle dabei die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls spielt. Dazu bestimmten wir die spezifische Zytotoxizität der NK Zellen.

Zunächst sind in Tabelle 23 und Abbildung 16 die Daten aus unserem Experiment mit humanen NK Zellen von Spender 4 dargestellt. Vor AT zeigte sich eine spezifische Zytotoxizität der NK Zellen von 9,3 %  $\pm$  0,5 (Mittelwert  $\pm$  SD). Für den *in vitro* Versuch nach AT konnten wir nur aus den Milzproben der Gruppe mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex genügend NK Zellen für die Versuchsdurchführung isolieren (siehe in Abschnitt 3.1 beobachteter Effekt). Dabei zeigte sich eine geringere spezifische Zytotoxizität der NK Zellen nach AT im Vergleich zu vor AT (MW  $\pm$  SD: 4,2 %  $\pm$  0,2). Dergleichen zeigte sich in der Berechnung der spezifischen Zytotoxizität der NK Zellen nach AT normiert zur Kontrolle vor AT (MW  $\pm$  SD: 0,5  $\pm$  0,02). Zusammenfassend konnten wir in diesem Experiment beobachten, dass die *in vitro* Zytotoxizität humaner NK Zellen vor AT höher ist als nach AT in NRG Mäuse mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex.

**Tabelle 23: Darstellung der *in vitro* Zytotoxizität von humanen NK Zellen von Spender 4 vor bzw. nach AT in NRG Mäuse.** Dargestellt sind Untersuchungen zur Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen von humanen NK Zellen (Spender 4) vor und nach AT in NRG Mäuse mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex. Die Daten inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) repräsentieren ein Experiment mit einer Maus.

	Spezifische Zytotoxizität der NK Zellen (%)		Spezifische Zytotoxizität der NK Zellen nach AT normiert zur Kontrolle vor AT [ ]
	Spender 4 vor AT	Spender 4 nach AT in NRG mit IL15	
	9,4	4,1	0,4
	9,6	4,3	0,5
	8,6		
	9,6	nicht erhoben	nicht erhoben
	7,9		
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b>9,3 <math>\pm</math> 0,5</b>	<b>4,2 <math>\pm</math> 0,2</b>	<b>0,5 <math>\pm</math> 0,02</b>



**Abbildung 16: Die Zytotoxizität humaner NK Zellen ist vor AT höher als nach AT in NRG Mäuse mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex.** Darstellung der spezifischen Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen von humanen NK Zellen (Spender 4) vor und nach AT in NRG Mäuse mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex (A) und der zur Kontrolle vor AT normierten Zytotoxizität nach AT (B) (siehe Tabelle 1). Dargestellt sind zusammenfassend die Analysedaten an Tag 8 mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Es handelt sich um ein Experiment mit einer Maus mit IL15/IL15R $\alpha$ -Supplementation.

Dieselbe Beobachtung machten wir in unseren Experimenten mit humanen NK Zellen von Spender 2 (Tabelle 24, Tabelle 25 und Abbildung 17). Vor AT zeigte sich eine spezifische Zytotoxizität der NK Zellen von  $10 \% \pm 0,6$  (MW  $\pm$  SD). Die spezifische Zytotoxizität der Milzproben der verschiedenen Versuchsgruppen „NRG mit IL15“ und „NRG mit B27“ sowie der Kontrollgruppe „NRG“ nach AT war geringer (MW  $\pm$  SD: „NRG“  $2,9 \% \pm 2,3$ , „NRG mit IL15“  $7,7 \% \pm 2,3$ , „NRG mit B27“  $2,8 \% \pm 0,9$ ).

Zusätzlich ließ sich in diesen Experimenten ein deutlicher Effekt der Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex auf die *in vitro* Zytotoxizität nach AT beobachten. Der Mittelwert für die Versuchsgruppe „NRG mit IL15“ war mit  $7,7 \%$  deutlich höher als für die Kontrollgruppe „NRG“ mit  $2,9 \%$ .

Für die Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens konnte kein Effekt beobachtet werden. Der Mittelwert der spezifischen Zytotoxizität für die Versuchsgruppe „NRG mit B27“ entsprach mit  $2,8 \%$  in etwa dem der Kontrollgruppe „NRG“ mit  $2,9 \%$ .

**Tabelle 24: Darstellung des Effektes der Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex auf die *in vitro* Zytotoxizität humaner NK Zellen von Spender 2 nach AT in NRG Mäuse.** Dargestellt sind Untersuchungen zur Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen von humanen NK Zellen (Spender 2) vor und nach AT in NRG Mäuse wahlweise mit oder ohne Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex bzw. in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens. Die Daten inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) repräsentieren drei Experimente mit einer Maus je Gruppe.

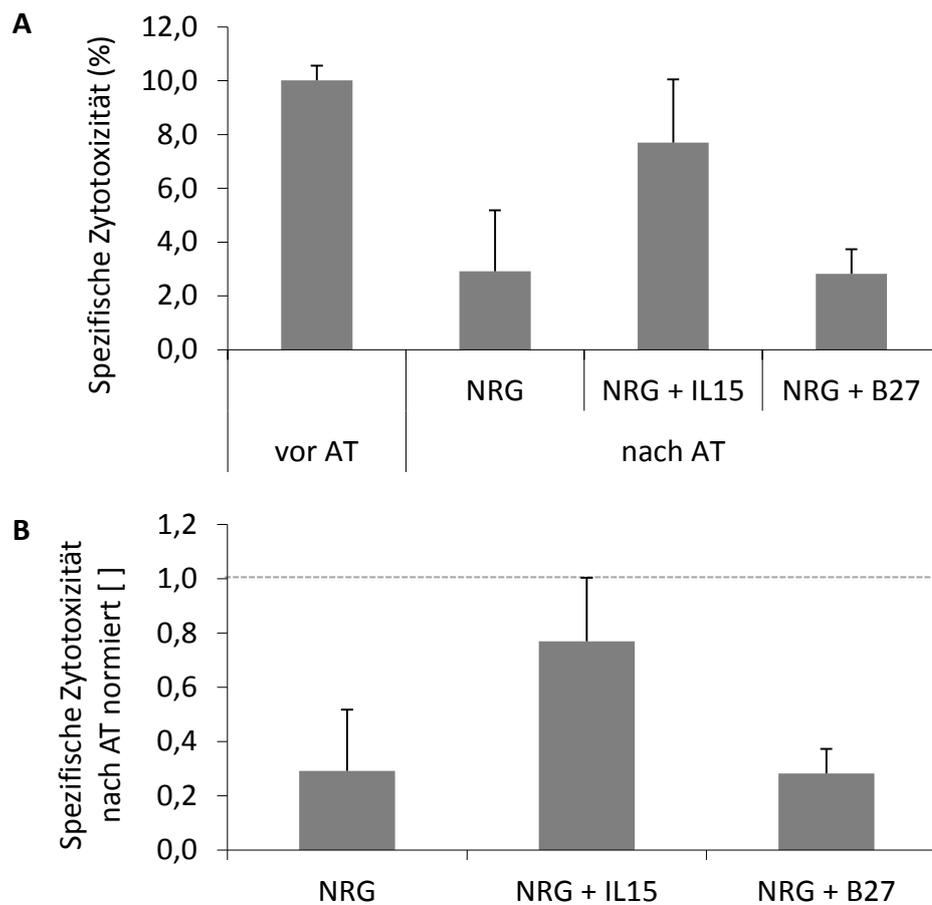
	Spezifische Zytotoxizität der NK Zellen (%)			
	Spender 2 vor AT	Spender 2 nach AT in		
		NRG	NRG mit IL15	NRG mit B27
	10,5	5,3	6,0	3,5
	10,1	2,6	9,4	3,1
	9,4	0,8	nicht erhoben	1,8
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b>10,0 <math>\pm</math> 0,6</b>	<b>2,9 <math>\pm</math> 2,3</b>	<b>7,7 <math>\pm</math> 2,3</b>	<b>2,8 <math>\pm</math> 0,9</b>

Zusammenfassend konnten wir beobachten, dass die Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens die Zytotoxizität

humaner NK Zellen nach AT in NRG Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Dies bestätigte die Berechnung der spezifische Zytotoxizität der NK Zellen nach AT normiert zur Kontrolle vor AT (MW  $\pm$  SD: „NRG“  $0,3 \pm 0,2$ , „NRG mit IL15“  $0,8 \pm 0,2$ , „NRG mit B27“  $0,3 \pm 0,1$ , Tabelle 25).

**Tabelle 25: Darstellung des Effektes der Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex auf die *in vitro* Zytotoxizität humaner NK Zellen nach AT in NRG Mäuse.** Dargestellt sind Untersuchungen zur Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen von humanen NK Zellen (Spender 2) nach AT in NRG Mäuse wahlweise mit oder ohne Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex bzw. in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens normiert zur Kontrolle vor AT. Die Daten inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) repräsentieren zwei unabhängige Experimente mit einer Maus je Gruppe.

	Spezifische Zytotoxizität der NK Zellen nach AT normiert zur Kontrolle vor AT [ ]		
	NRG	NRG mit IL15	NRG mit B27
	0,5	0,6	0,4
	0,3	0,9	0,3
	0,1	nicht erhoben	0,2
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	<b><math>0,3 \pm 0,2</math></b>	<b><math>0,8 \pm 0,2</math></b>	<b><math>0,3 \pm 0,1</math></b>



**Abbildung 17: Die Supplementation von humanem IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens erhält die Zytotoxizität humaner NK Zellen nach AT in NRG Mäuse.** Darstellung der spezifischen Zytotoxizität gegenüber K562-Zellen von humanen NK Zellen (Spender 2) (A) vor und nach AT in NRG Mäuse wahlweise ohne und mit Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex bzw. in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens und (B) der zur Kontrolle vor AT normierten Zytotoxizität nach AT (siehe Tabelle 2 und 3). Dargestellt sind zusammenfassend die Analysedaten an Tag 8 mit Mittelwerten und Standardabweichungen. Es handelt sich um zwei unabhängige Experimente mit je einer Maus ohne bzw. mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation bzw. in Gegenwart oder Abwesenheit des humanen MHC-B27-Transgens.

## 4 Diskussion

In den letzten Jahren konnten durch Mausmodelle viele Erkenntnisse das Verständnis von NK Zell-vermittelten *Graft-versus-Leukemia* (GvL)-Effekten vergrößern. Dabei konnten NK Zell-vermittelte Anti-Tumor-Effekte zunächst nur für die adulte AML, nicht aber die adulte ALL nachgewiesen werden (Ruggeri et al. 2001; Ruggeri et al. 2002). Da die kindliche BCP-ALL eine gänzlich andere Entität darstellt, gibt es seit längerem Bestrebungen in der Abteilung von Prof. R. Handgretinger, GvL-Effekte gegenüber der kindlichen BCP-ALL zu charakterisieren. In diesem Sinne wurden durch unsere Arbeitsgruppe verschiedene xenogene Mausmodelle entwickelt und in individualisierter Form NK Zell-vermittelte GvL-Effekte untersucht (André et al. 2010; Woiterski et al. 2013, Kübler et al., 2014). Da sich in humanisierten NSG Mäusen unter der alleinigen Substitution von IL7 nur funktionell anerge NK Zellen generieren ließen, sollte in dieser Arbeit der Einfluss einer Supplementation von IL15 bzw. der Einfluss eines zusätzlich in die Mäuse eingeführten menschlichen MHC-B27-Transgens untersucht werden. Zur Vereinfachung des experimentellen Aufbaus wurden diese Untersuchungen in einem adoptiven Transfermodell vorgenommen, in dem reife humane NK Zellen adoptiv in Mausmodelle transferiert wurden.

Die Supplementation mit IL15 ist nach früheren Studien *in vivo* essentiell für das Überleben reifer muriner NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in IL15-defiziente Mäuse (Cooper et al. 2002; Prlic et al. 2003). In unserem murinen Xenotransplantationsmodell sahen wir den Effekt nach AT reifer humaner NK Zellen insofern, als die Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex zu deutlich höheren NK Zell-Frequenzen an Tag 7 bzw. 8 nach AT humaner NK Zellen in NRG bzw. NSG Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe „ohne IL15“ führte. Dem zu Grunde liegt vermutlich die bereits beschriebene anti-apoptotische Wirkung, welche IL15 über eine Expressionssteigerung des anti-apoptotischen Faktors Bcl 2 auf der Oberfläche der NK Zellen ausübt und hierdurch letztlich das Überleben der transferierten NK Zellen erhöht (Carson et al. 1997; Ranson et al. 2003). Unwahrscheinlich erscheint eine

Steigerung der NK Zell-Frequenz durch eine vermehrte IL15-induzierte Proliferation. Zum einen, weil in Arbeiten anderer Gruppen unter IL15-Supplementation keine Proliferation von murinen NK Zellen fünf Tage nach AT in IL15<sup>-/-</sup> Mäuse beobachtet werden konnte (Cooper et al. 2002). Zum anderen, weil neuere Versuche eine Expansion von humanen NK Zellen unter IL15-Gabe erst zwischen Tag 7 und 21 nach AT in NSG Mäuse zeigen (Miller et al. 2014). Des Weiteren ist für reife CD56<sup>dim</sup> NK Zellen, welche den hauptsächlichen Anteil unserer transferierten NK Zellen bildeten, *in vitro* durch IL15-Gabe keine Proliferation beschrieben (Romagnani et al. 2007; Carson et al. 1994). Zur sicheren Klärung müsste man eine Markierung der NK Zellen vor AT beispielsweise mit CFSE durchführen und die Kinetik der CFSE-Frequenz *in vivo* quantifizieren.

Daneben konnte in der Vergangenheit eine Wirkung von IL15 auf die Rezeptor-Expression von NK Zellen beobachtet werden. Welchen Einfluss humanes IL15 auf den Phänotyp von humanen NK Zellen im Mausmodell hat, ist dabei bislang noch nicht ausreichend definiert, sodass wir in dieser Arbeit den Einfluss einer IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation auf die Expression der inhibierenden KIRs und des NKG2A-Rezeptors und der aktivierenden NK Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp44 nach AT reifer humaner NK Zellen in unsere murinen Rezipienten untersuchten. In dem von uns beobachteten Zeitraum von 7-8 Tagen änderte sich die Expression dieser NK Zell-Rezeptoren kaum. Dabei ist vermutlich entscheidend, dass die von uns verwendeten humanen NK Zellen zum größten Teil unter physiologischen IL15-Konzentrationen in humanen Spendern gebildet wurden und voll ausdifferenziert waren. Daher waren sie bereits vor AT zu großen Teilen positiv für die Rezeptoren CD16, KIR, NKG2A und NKG2D (MW  $\pm$  SD: CD16<sup>+</sup>: 83,6 %  $\pm$  4,2; KIR<sup>+</sup>: 48,8 %  $\pm$  7,5; NKG2A<sup>+</sup>: 39,4 %  $\pm$  13,7; NKG2D<sup>+</sup>: 86,7 %  $\pm$  10,1). So konnten wir nach AT auch in der Gruppe mit IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation im Vergleich zu vor AT bzw. zur Kontrollgruppe „ohne IL15“ keine signifikante Hochregulation der Rezeptor-Expressionen beobachten, wie sie sich in vergangenen Untersuchungen zur Ontogenese von NK Zellen zeigte. In einem Modell zur Charakterisierung der NK Zell-Entwicklung aus humanen CD34<sup>+</sup> Stammzellen *in vitro* war neben dem direkten Kontakt zu Stromazellen die

Supplementation von IL15 wesentlich für die Bildung von NKG2A<sup>+</sup> und KIR<sup>+</sup> NK Zellen, da ohne Zytokingabe hauptsächlich NKG2A<sup>-</sup> und KIR<sup>-</sup> NK Zellen gebildet wurden (Miller und McCullar 2001). Eine Hochregulation der NKG2A-Expression durch IL15 konnte auch bei der Reifung von NK Zellen aus unreifen Thymozyten beobachtet werden (Mingari et al. 1997). Außerdem wurde gezeigt, dass durch IL15-Supplementation in Kulturen von CD56<sup>bright</sup> und KIR<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> NK Zellen *in vitro* bzw. im Mausmodell durch IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Gabe *in vivo* neben der KIR-Expression die Expression des CD16-Rezeptors gesteigert wird (Romagnani et al. 2007; Rham et al. 2007; Cichocki et al. 2009; Huntington et al. 2009; André und Kübler, unpublizierte Daten). Nicht zuletzt führte die IL15-Stimulation *in vitro* zu einer Erhöhung der NKG2D- und NKp44-Expression (Rham et al. 2007; Zhang et al. 2008). In Zusammenschau dieser Ergebnisse wird dem Zytokin IL15 nicht nur eine wichtige Rolle in der Differenzierung von NK Zellen (durch Hochregulierung von CD16, NKG2A und KIR), sondern auch für die Aktivität von NK Zellen (NK Zell-Inhibierung über inhibierende KIRs und NKG2A-Rezeptor, NK Zell-Aktivierung über NKG2D und NKp44) zugeschrieben. Die Wirkung von IL15 auf die von uns untersuchten Rezeptoren wird nun in den folgenden Abschnitten im Einzelnen erörtert.

Die Expression von CD16 ist ein Charakteristikum der CD56<sup>dim</sup> NK Zellen (Freud und Caligiuri 2006; Lanier et al. 1986). Im peripheren Blut liegen ungefähr 90 % der NK Zellen als CD16<sup>-</sup> CD56<sup>dim</sup> Zellen vor (Lanier et al. 1986). Bei unseren frisch isolierten NK Zellen vor AT betrug die Frequenz der CD56<sup>dim</sup> Population 83,6 % und die der CD16<sup>-</sup> CD56<sup>bright</sup> Population 3,2 %. Bei der Analyse nach adoptivem Transfer der humanen NK Zellen an Tag 7 bzw. 8 war das Verhältnis der Populationen noch stärker zu Gunsten der CD56<sup>dim</sup> Population verschoben, sowohl in der Gruppe „ohne IL15“ als auch in der Gruppe „mit L15“. Zum einen ist vermutlich das Überleben der humanen CD56<sup>bright</sup> NK Zellen im murinen Xenotransplantationsmodell geringer als das der CD56<sup>dim</sup> NK Zellen, wobei IL15 zusätzlich alleinig das Überleben der CD56<sup>dim</sup> Subpopulation verbessert, da unter IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation im Verhältnis besonders wenige CD56<sup>bright</sup> NK Zellen auffindbar waren (Ranson et al. 2003; Michaud et al. 2010). Diese Beobachtung könnte zum anderen auch für eine durch IL15-bedingte Differenzierung

von CD56<sup>bright</sup> zu CD56<sup>dim</sup> (durch Hochregulierung von CD16) sprechen (Romagnani et al. 2007; Huntington et al. 2009; André, unpublizierte Daten). Für das Überleben der CD56<sup>bright</sup> NK Zellen sind möglicherweise andere Zytokine von Bedeutung. So beobachteten Michaud und seine Kollegen, dass sich das Überleben von CD56<sup>bright</sup> in *in vitro* Kulturen durch die Gabe von IL7 steigern lässt, während die Supplementation von IL15 keinen Effekt auf das Überleben der CD56<sup>bright</sup> Population hatte (Michaud et al. 2010).

Für den NKG2A-Rezeptor und die inhibitorischen KIRs zeigte sich für die Gruppe „mit IL15“ keine Veränderung der Expression. Dies beobachteten auch Rham und seine Kollegen *in vitro*, die durch IL15 zwar eine Steigerung der KIR-Expression von KIR<sup>-</sup> NK Zellen, nicht aber von bereits vor Kultur KIR<sup>+</sup> NK Zellen feststellten (Rham et al. 2007). Der NKG2A-Rezeptor wird in der Reifung der NK Zellen vor den KIR exprimiert und seine Expression sinkt mit steigender KIR-Expression (Cooley et al. 2007; Yawata et al. 2008). Eine derartige sequentielle Rezeptorexpression zeigte sich bei unseren reifen NK Zellen nicht. Für die Gruppe „ohne IL15“ zeigte sich eine leichte Erhöhung der KIR-Expression und eine ebenso geringe Erniedrigung des NKG2A-Rezeptors, jedoch sind diese Veränderungen als nicht signifikant anzusehen.

Daneben konnten wir keine Veränderung der NKG2D-Expression sowohl in der Gruppe „mit IL15“ also auch in der Kontrollgruppe „ohne IL15“ beobachten. Da bei uns die NKG2D-Rezeptor-Expression schon vor AT mit 86,3 % hoch war, sahen wir nicht wie Zhang und seine Kollegen eine Steigerung der NKG2D-Expression durch IL15 (Zhang et al. 2008). Sie beobachteten nach Inkubation mit IL15 über 48 Stunden eine Erhöhung der NKG2D-Expression von 14,7 % auf 47,5 % (Zhang et al. 2008).

Dagegen war die Nkp44-Expression auf unseren frisch isolierten NK Zellen mit 1,1 % niedrig. Eine Erhöhung durch IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex-Supplementation wie bei Rham und Kollegen konnten wir allerdings nicht beobachten (Rham et al. 2007). Grund dafür war möglicherweise die fehlende Ko-Stimulation der transferierten NK Zellen in unserem Mausmodell beispielsweise durch einen inflammatorischen Stimulus (etwa einem TLR Agonisten wie Poly I:C). In vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe führte eine langfristige hochdosierte IL7-Supplementation zu hoher Expression von

NKp44 auf humanen NK Zellen in NSG Mäusen (André et al. 2010). Im Unterschied zu den Versuchen in dieser Arbeit wurden die humanen NK Zellen in den vorherigen Versuchen nicht adoptiv transferiert, sondern differenzierten sich über einen längeren Zeitraum hinweg aus transplantierten humanen CD34<sup>+</sup> Stammzellen (André et al. 2010). In diesen sogenannten humanisierten Mäusen führte die langfristige, alleinige Supplementation von IL7 v.a. zur Bildung von CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup> NK Zellen (André et al. 2010).

Da sich in diesen Experimenten unserer Arbeitsgruppe außerdem zeigte, dass die NK Zell-Funktionalität in humanisierten NSG Mäusen durch die alleinige Gabe von IL7 reduziert war und demgegenüber für das Zytokin IL15 eine zytotoxizitätssteigernde Wirkung beschrieben ist, untersuchten wir die Wirksamkeit einer Supplementation mit humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex auf die Funktionalität der humanen NK Zellen nach AT. In den von uns durchgeführten AT-Experimenten mit humanen NK Zellen zeigte sich, dass die NK Zellen nach AT ohne Zytokinsupplementation nur gering funktionsfähig waren. Durch die Supplementation mit humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex ließ sich die Funktionalität erhalten – wenn auch nicht in dem Maße wie vor AT. Eine Steigerung der Zytotoxizität, wie sie in *in vitro* Kulturen von NK Zellen mit IL15 (Zhang et al. 2008) und *in vivo* in hIL15-transgenen Mäusen (Marks-Konczalik et al. 2000) gemessen wurde, konnten wir nicht beobachten. Dies liegt vermutlich daran, dass wir unsere NK Zellen nicht erneut mit IL15 direkt vor dem Zytotoxizitätstest inkubierten.

Neben inflammatorischen Zytokinen wie IL15 können MHC-Moleküle die Funktionalität von NK Zellen modulieren, in dem sie die Unterscheidung „selbst“/„nicht selbst“ ermöglichen (Furukawa et al. 1999; Kim et al. 2005). Daher wollten wir die Wirkung des menschlichen MHC-B27-Transgens in unserem murinen Xenotransplantationsmodell untersuchen.

Über den Einfluss eines MHC-Transgens in der Maus auf das Überleben adoptiv transferierter humaner NK Zellen wurde nach unserem Kenntnisstand bislang nicht berichtet. In unserem Modell mit einem menschlichen MHC-B27-Transgen konnte

keine Steigerung der NK Zell-Frequenz im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Dagegen wird in der Literatur ein Einfluss von MHC-Klasse-1-Genen auf den Phänotyp von NK Zellen diskutiert, da die MHC-Klasse-1-Moleküle die Liganden für die inhibierenden NK Zell-Rezeptoren (KIR (human), Ly49 (murin) und NKG2A (human und murin)) bilden. Während Andersson und ihre Kollegen keinen Einfluss von MHC-Klasse-1-Liganden auf die KIR-Expression humaner NK Zellen fanden (Andersson et al. 2009), zeigen andere Studien, dass es einen Einfluss des MHC-Genotyps auf die KIR-Expression gibt (Yawata et al. 2006; Schönberg et al. 2011). So fanden Schönberg und seine Kollegen in MHC-C2-homozygoten Individuen eine vermehrte Expression von KIR2DL1 und in MHC-C1-homozygoten von KIR2DL3 (Schönberg et al. 2011). Außerdem beobachteten sie, dass die verschiedenen inhibitorischen KIRs in einer bestimmten Reihenfolge in der Entwicklung exprimiert werden, beispielsweise KIR2DL3 vor KIR2DL1 (Schönberg et al. 2011). Auf Grundlage ihrer Erkenntnisse postulieren sie ein „Liganden-ausbildendes Modell“, welches besagt, dass die Hochregulation von zusätzlichen KIRs nach Interaktion eines inhibierenden Rezeptors mit seinem MHC-Selbst-Liganden beendet bzw. unwahrscheinlich wird (Schönberg et al. 2011). Für diese These spricht auch, dass in MHC-Klasse-1-defizienten Patienten NKG2A hoch exprimiert vorliegt und eine prozentual größere Fraktion an NKG2A<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup> NK Zellen gebildet wird. In diesem Sinne würde die Expression weiterer KIRs unter diesen Bedingungen nicht durch die Bindung eines KIR an einen MHC-Selbstliganden gestoppt werden (Zimmer et al. 1998; Sleiman et al. 2014).

In unseren Versuchen mit humanen NK Zellen gesunder Spender konnten wir keine Veränderung der NKG2A- und eine leichte Hochregulation der KIR-Expression nach AT sowohl in für humane MHC-negative als auch in MHC-B27-Transgen positiven Mäusen beobachten. In früheren Transferversuchen mit murinen NK Zellen konnte gezeigt werden, dass murine MHC-defiziente NK Zellen in einer MHC-suffizienten Umgebung Ly49-Rezeptoren herunterregulieren (Elliott et al. 2010). Unsere humanen NK Zellen kamen bereits aus für das MHC-Bw4 homo- oder heterozygoter Umgebung, sodass wir keine Herunterregulierung des MHC-Bw4 spezifischen Rezeptors KIR3DL1 nach

Transfer in eine, durch das MHC-B27-Transgen, Bw4 positive Umgebung erwarten können. Möglicherweise kommt es im Gegenzug bei uns zu einer Hochregulation anderer KIRs. Damit man zum KIR-Repertoire nach AT in den verschiedenen Versuchsgruppen „mit“ und „ohne B27“ genaue Aussagen machen könnte, müsste man die verschiedenen KIR-Rezeptoren durchflusszytometrisch einzeln bestimmen. Allerdings sind Schlussfolgerungen anhand dieses einfachen Modells schwierig, da der Einfluss von MHC-Molekülen auf den NK Zell-Phänotyp sehr komplex ist. Dabei scheint gerade die MHC-Umgebung für die Ontogenese des KIR-Repertoires von NK Zellen von elementarer Bedeutung zu sein. Dies belegen Untersuchungen, bei denen die Entwicklung von NK Zellen aus humanen Stammzellen in Kultur mit Stromazellen und Zytokinen wie IL15 analysiert wurden (Miller und McCullar 2001). Dabei zeigte der MHC-Typ der Stammzellen keinen Einfluss auf die KIR-Expression der *in vitro* entwickelten NK Zellen (Miller und McCullar 2001), wohingegen der MHC-Typ der Stromazellen in *in vitro* Kultur mit murinen KM-gereiften Vorläuferzellen einen Einfluss auf die Ly49-Expression der gebildeten murinen NK Zellen hatte (Roth et al. 2000). Infolgedessen gewinnen zukünftige Versuche zur Ontogenese von NK Zellen aus humanen Stammzellen in humanen MHC-Transgenen Mäusen an Bedeutung. Beispielweise konnten van Bergen und seine Kollegen jüngst beobachten, dass in MHC-Cw3-Transgenen Mäusen die Expression von NKG2A und dem für MHC-Cw3 spezifischen KIR2DL2 auf NK Zellen im Vergleich zur Expression in MHC-Klasse-1a-defizienten Kontrollmäusen erniedrigt ist (van Bergen et al. 2013).

Neben den an MHC-Klasse-1-Moleküle bindenden Rezeptoren NKG2A und KIR analysierten wir die Expression des CD16-Rezeptors und der aktivierenden NK Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp44. Für die Expression dieser Rezeptoren konnten wir zwischen der Gruppe mit MHC-B27-Transgen und der Kontrollgruppe ohne Transgen keinen Unterschied beobachten. Grund dafür ist vermutlich, dass diese Rezeptoren nicht an MHC-Moleküle binden (Moretta et al. 2001) und diese daher keinen Einfluss auf die Expressionslevels haben. So zeigt sich beispielsweise in MHC-Klasse-1-defizienten Patienten die gleiche Anzahl an NK Zellen mit normalen Rezeptor-

Expressionen für CD16 wie in Gesunden (de la Salle et al. 1994; Sleiman et al. 2014; Zimmer et al. 1998).

Darüber hinaus untersuchten wir, inwieweit die Gegenwart des MHC-B27-Transgens für die Funktionalität der humanen NK Zellen nach AT in ein Mausmodell von Bedeutung ist. In unserem Modell konnte die Zytotoxizität von humanen NK Zellen nach AT in NRG Mäuse weder in noch ohne Gegenwart des menschlichen MHC-B27-Moleküls erhalten werden. In früheren Studien zeigte sich, dass funktionell kompetente murine NK Zellen aus MHC-suffizienter Umgebung nach AT in eine MHC-negative Umgebung ihre Funktionalität verlieren und dass andererseits funktionell inkompetente, reife NK Zellen aus MHC-defizienter Umgebung nach AT in eine MHC-suffiziente Umgebung funktionell aktiv werden (Joncker et al. 2010; Elliott et al. 2010). Da in unserem Modell durch die Gegenwart eines menschlichen MHC-B27-Moleküls die Zytotoxizität von humanen NK Zellen nach AT in NRG Mäuse nicht erhalten bleibt, vermuten wir, dass die alleinige Expression eines MHC-B27-Moleküls nicht ausreichend für eine volle funktionelle Kompetenz von adoptiv transferierten humanen NK Zellen ist. Aus Experimenten mit murinen NK Zellen weiß man, dass die Expression verschiedener Ly49-Rezeptoren zu unterschiedlichem funktionellem Ansprechen führt (Kim et al. 2005) und verschiedene MHC-Moleküle unterschiedlichen Einfluss auf die Ausbildung funktioneller Kompetenz von NK Zellen haben (Johansson et al. 2005). Bei humanen KIR<sup>+</sup> NK Zellen konnte durch die Bindung an MHC-B oder MHC-C bislang eine gleiche funktionelle Kompetenz beobachtet werden (Yu et al. 2007). Dabei haben KIR3DL1<sup>+</sup> NK Zellen eine hohe Reaktivität in MHC-Bw4-positiver Umgebung (Yawata et al. 2008), wobei verschiedene Bw4-Epitope unterschiedlich stark auf das funktionelle Ansprechen der NK Zellen wirken. Außerdem konnte in Organismen, die homozygot für MHC-Bw4 sind, eine im Vergleich zu heterozygoten Merkmalsträgern gesteigerte Aktivität der KIR3DL1<sup>+</sup> NK Zellen beobachtet werden. In unserem Modell sind die NRG Mäuse heterozygot für das MHC-B27-Gen, da homozygote Mäuse nicht überlebensfähig sind. Dadurch ist der Einfluss des Transgens möglicherweise vermindert. Außerdem haben wir im Modell mit dem MHC-B27-Molekül nur einen MHC-Liganden für die KIRs. Man weiß aber, dass NK Zellen, die mehrere KIRs für

spezifische körpereigene MHC exprimieren, funktionell aktiver sind als NK Zellen mit nur einem KIR (Yu et al. 2007; Joncker et al. 2010; Yawata et al. 2008).

Ebenso konnte in der Vergangenheit bei Versuchen an Mäusen mit einem humanem MHC-Cw3-Transgen keine Steigerung der Funktion durch den KIR-Liganden gefunden werden (van Bergen et al. 2013). Dabei zeigte sich nach Depletion der NKG2A<sup>+</sup> NK Zell-Subpopulation eine Relevanz des KIR-Repertoires der verbliebenen NK Zellen für die funktionelle Aktivität gegen MHC-Cw3-negative Zellen (van Bergen et al. 2013).

Außerdem war die von uns im Zytotoxizitätstest verwendete Zielzelle negativ für alle MHC-Moleküle. Eine andere Zelllinie wie beispielsweise die Zelllinie 721.221, in die sich transgen verschiedene MHC-Liganden einbringen lassen, wäre möglicherweise für die Untersuchung der spezifischen Rezeptor-MHC-Interaktion geeigneter gewesen, da man nicht nur die Aktivierung, sondern auch die Inhibierung der NK Zellen durch für MHC-spezifische inhibitorische KIRs ermitteln kann (Yu et al. 2007).

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit beobachten, dass die alleinige Präsenz des MHC-B27-Transgens in unserem Xenotransplantationsmodell keinen Einfluss auf den Phänotyp und die Funktionalität reifer humaner NK Zellen in dem Beobachtungszeitraum von 7 bzw. 8 Tagen nach AT hat. Möglicherweise ist die MHC-Edukation für die Ausbildung funktioneller Kompetenz gegen maligne und körperfremde Zellen von unreifen NK Zellen bedeutender. Daher scheint es für zukünftige Experimente besonders interessant zu sein, den Einfluss der Variabilität von humanen MHC-B- und/oder -C-Transgenen auf die Ontogenese von transplantierten humanen hämatopoetischen Stammzellen (HSC) zu reifen, funktionell kompetenten humanen NK Zellen zu untersuchen.

Gegenüber dem MHC-B27-Transgen führte die Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex in unserem Modell zu einer Erhöhung der NK Zell-Frequenz nach AT und zum Erhalt der Funktionalität der humanen NK Zellen im Beobachtungszeitraum. In der Literatur zeigte IL15 außerdem eine große Bedeutung für die NK Zell-Ontogenese (Meazza et al. 2011), sodass für die Bildung reifer,

funktionsfähiger humaner NK Zellen aus transplantierten humanen HSC im Mausmodell eine zusätzliche – beispielweise Transgen-vermittelte – Expression von humanem IL15 relevant erscheint.

Insgesamt zeigten wir hier, dass NK Zellen nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse ihre Funktionalität verlieren, während sich ihr Phänotyp kaum verändert. Durch Supplementation mit humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex, nicht aber durch Präsenz des humanen MHC-B27-Transgen konnte die Funktionalität im Modell erhalten werden. Dabei ist wesentlich zu beachten, dass unsere Ergebnisse auf relativ kleinen Mausezahlen beruhen. Um diese zu verifizieren, sind in Zukunft Versuche mit größeren Mausezahlen notwendig.

## 5 Zusammenfassung

Diese Dissertationsschrift befasst sich mit der Frage, ob sich der Phänotyp und die Funktionalität humaner NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in ein murines Xenotransplantationsmodell erhalten lassen und welchen Einfluss dabei die Supplementation des Zytokins IL15 oder die Präsenz eines menschlichen MHC-B27-Transgens in der Maus haben. NK Zellen sind als große granuläre Lymphozyten wichtige Zellen des Immunsystems, da sie ohne vorherige Sensibilisierung in der Lage sind, virusinfizierte oder entartete Zellen zu bekämpfen. Für die NK Zell-Biologie sind dabei das Zytokin IL15 – da es v.a. die Differenzierung, Apoptose und Aktivität von NK Zellen moduliert – und die Interaktion mit körpereigenen MHC-Klasse-1-Molekülen auf Zelloberflächen von entscheidender Bedeutung. Welche Bedeutung humanes IL15 und humane MHC-Moleküle in Mausmodellen für die Funktionalität von humanen, adoptiv transferierter NK Zellen hat, war bislang unklar.

Für die Versuche wurden zunächst humane NK Zellen freiwilliger Spender adoptiv in NOD/Rag1<sup>-/-</sup>/γc<sup>-/-</sup> (NRG) bzw. NOD/SCID/γc<sup>-/-</sup> (NSG) Mäuse transferiert. Ein Teil der Mäuse erhielt nach AT an Tag 1 und 4 IL15/IL15Rα-Komplex supplementiert, ein anderer Teil der NRG Mäuse exprimierte das zusätzliche humane MHC-B27-Transgen. Die Expression der inhibierenden KIRs und des NKG2A-Rezeptors bzw. der aktivierenden NK Zell-Rezeptoren NKG2D und NKp44 wurde durchflusszytometrisch bestimmt und die Funktionalität der NK Zellen mittels *in vitro* Zytotoxizitätsuntersuchungen vor (Tag 0) und nach (Tag 7 oder 8) AT quantifiziert. Die Ergebnisse beider Gruppen „mit IL15“ und „mit B27“ wurden mit denen ihrer jeweiligen Kontrollgruppen „ohne IL15“ bzw. „ohne B27“ verglichen.

Es zeigte sich nach AT humaner NK Zellen, dass die Supplementation von humanem IL15/IL15Rα-Komplex die NK Zell-Frequenzen in NRG bzw. NSG Mäusen erhöht, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens. Der Phänotyp der humanen NK Zellen war in allen vier Versuchsgruppen „ohne IL15“, „mit IL15“, „ohne B27“ und „mit B27“ nach AT im Vergleich zu vor AT nicht signifikant verändert, sodass sich kein Effekt durch die IL15/IL15Rα-Supplementation oder die MHC-B27-Präsenz beobachten ließ. Die

Funktionalität humaner NK Zellen nach AT war in der Gruppe „mit IL15“, nicht aber in den anderen drei Gruppen erhalten geblieben.

Die bereits in früheren Studien beschriebene Relevanz von IL15 auf die NK Zell-Biologie zeigte sich auch für die Funktionalität der in das murine Modell adoptiv transferierten humanen NK Zellen. Durch die Präsenz des humanen MHC-B27-Transgens konnte im AT-Modell kein Effekt beobachtet werden. Um murine Modelle – in Bezug auf die Differenzierung von transplantierten humanen Stammzellen in reife, funktionsfähige NK Zellen – weiter optimieren zu können, erscheinen daher in Zukunft Versuche mit dem gleichzeitigen Vorhandensein mehrerer, variabler MHC-B und -C-Transenge unter diffiziler Expression mit humanen Zytokinen wie IL15 wegweisend.

## 6 Literaturverzeichnis

Allavena, P.; Giardina, G.; Bianchi, G.; Mantovani, A. (1997): IL-15 is chemotactic for natural killer cells and stimulates their adhesion to vascular endothelium. In: *J Leukoc Biol* 61 (6), S. 729–735.

Alter, Galit; Malenfant, Jessica M.; Altfeld, Marcus (2004): CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. In: *J Immunol Methods* 294 (1-2), S. 15–22. DOI: 10.1016/j.jim.2004.08.008.

Anderson, D. M.; Kumaki, S.; Ahdieh, M.; Bertles, J.; Tometsko, M.; Loomis, A. et al. (1995): Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes. In: *J Biol Chem* 270 (50), S. 29862–29869.

Andersson, Sandra; Fauriat, Cyril; Malmberg, Jenny-Ann; Ljunggren, Hans-Gustaf; Malmberg, Karl-Johan (2009): KIR acquisition probabilities are independent of self-HLA class I ligands and increase with cellular KIR expression. In: *Blood* 114 (1), S. 95–104. DOI: 10.1182/blood-2008-10-184549.

André, M. C.; Erbacher, A.; Gille, C.; Schmauke, V.; Goecke, B.; Hohberger, A. et al. (2010): Long-Term Human CD34+ Stem Cell-Engrafted Nonobese Diabetic/SCID/IL-2R null Mice Show Impaired CD8+ T Cell Maintenance and a Functional Arrest of Immature NK Cells. In: *The Journal of Immunology* 185 (5), S. 2710–2720. DOI: 10.4049/jimmunol.1000583.

Anfossi, Nicolas; Andre, Pascale; Guia, Sophie; Falk, Christine S.; Roetyneck, Sophie; Stewart, C. Andrew et al. (2006): Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. In: *Immunity* 25 (2), S. 331–342. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.06.013.

Aste-Amezaga, M.; D'Andrea, A.; Kubin, M.; Trinchieri, G. (1994): Cooperation of natural killer cell stimulatory factor/interleukin-12 with other stimuli in the induction of cytokines and cytotoxic cell-associated molecules in human T and NK cells. In: *Cell Immunol* 156 (2), S. 480–492. DOI: 10.1006/cimm.1994.1192.

Aversa, F.; Tabilio, A.; Velardi, A.; Cunningham, I.; Terenzi, A.; Falzetti, F. et al. (1998): Treatment of high-risk acute leukemia with T-cell-depleted stem cells from related donors with one fully mismatched HLA haplotype. In: *N Engl J Med* 339 (17), S. 1186–1193. DOI: 10.1056/NEJM199810223391702.

Bamford, R. N.; Grant, A. J.; Burton, J. D.; Peters, C.; Kurys, G.; Goldman, C. K. et al. (1994): The interleukin (IL) 2 receptor beta chain is shared by IL-2 and a cytokine, provisionally designated IL-T, that stimulates T-cell proliferation and the induction of lymphokine-activated killer cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (11), S. 4940–4944.

Bauer, S.; Groh, V.; Wu, J.; Steinle, A.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L.; Spies, T. (1999): Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. In: *Science* 285 (5428), S. 727–729.

- Baxter, A. G.; Cooke, A. (1993): Complement lytic activity has no role in the pathogenesis of autoimmune diabetes in NOD mice. In: *Diabetes* 42 (11), S. 1574–1578.
- Biassoni, Roberto; Cantoni, Claudia; Falco, Michela; Pende, Daniela; Millo, Romano; Moretta, Lorenzo et al. (2000): Human natural killer cell activating receptors. In: *Molecular Immunology* 37 (17), S. 1015–1024. DOI: 10.1016/S0161-5890(01)00018-9.
- Bodmer, Julia G.; Marsh, Steven G. E.; Albert, Ekkehard D.; Bodmer, Walter F.; Bontrop, Ronald E.; Charron, Dominique et al. (1997): Nomenclature for Factors of the HLA System, 1996. In: *Human Immunology* 53 (1), S. 98–128. DOI: 10.1016/S0198-8859(97)00031-1.
- Bonnet, D.; Warren, E. H.; Greenberg, P. D.; Dick, J. E.; Riddell, S. R. (1999): CD8(+) minor histocompatibility antigen-specific cytotoxic T lymphocyte clones eliminate human acute myeloid leukemia stem cells. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (15), S. 8639–8644.
- Braud, V. M.; Allan, D. S.; O'Callaghan, C. A.; Soderstrom, K.; D'Andrea, A.; Ogg, G. S. et al. (1998): HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. In: *Nature* 391 (6669), S. 795–799. DOI: 10.1038/35869.
- Brodin, Petter; Karre, Klas; Hoglund, Petter (2009a): NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. In: *Trends Immunol* 30 (4), S. 143–149. DOI: 10.1016/j.it.2009.01.006.
- Brodin, Petter; Lakshmikanth, Tadepally; Johansson, Sofia; Karre, Klas; Hoglund, Petter (2009b): The strength of inhibitory input during education quantitatively tunes the functional responsiveness of individual natural killer cells. In: *Blood* 113 (11), S. 2434–2441. DOI: 10.1182/blood-2008-05-156836.
- Bryceson, Yenan T.; March, Michael E.; Ljunggren, Hans-Gustaf; Long, Eric O. (2006): Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. In: *Immunol Rev* 214, S. 73–91. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00457.x.
- Bulfone-Paus, S.; Ungureanu, D.; Pohl, T.; Lindner, G.; Paus, R.; Ruckert, R. et al. (1997): Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo. In: *Nat Med* 3 (10), S. 1124–1128.
- Burkett, Patrick R.; Koka, Rima; Chien, Marcia; Chai, Sophia; Boone, David L.; Ma, Averil (2004): Coordinate expression and trans presentation of interleukin (IL)-15 $\alpha$  and IL-15 supports natural killer cell and memory CD8 $^{+}$  T cell homeostasis. In: *J Exp Med* 200 (7), S. 825–834. DOI: 10.1084/jem.20041389.
- Burkhardt, J. K.; Hester, S.; Argon, Y. (1989): Two proteins targeted to the same lytic granule compartment undergo very different posttranslational processing. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (18), S. 7128–7132.
- Cao, X.; Shores, E. W.; Hu-Li, J.; Anver, M. R.; Kelsall, B. L.; Russell, S. M. et al. (1995): Defective lymphoid development in mice lacking expression of the common cytokine receptor gamma chain. In: *Immunity* 2 (3), S. 223–238.

- Carson, W. E.; Fehniger, T. A.; Haldar, S.; Eckhert, K.; Lindemann, M. J.; Lai, C. F. et al. (1997): A potential role for interleukin-15 in the regulation of human natural killer cell survival. In: *J Clin Invest* 99 (5), S. 937–943. DOI: 10.1172/JCI119258.
- Carson, W. E.; Giri, J. G.; Lindemann, M. J.; Linett, M. L.; Ahdieh, M.; Paxton, R. et al. (1994): Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. In: *J Exp Med* 180 (4), S. 1395–1403.
- Chang, C.; Dietrich, J.; Harpur, A. G.; Lindquist, J. A.; Haude, A.; Loke, Y. W. et al. (1999): Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. In: *J Immunol* 163 (9), S. 4651–4654.
- Cohen, J. (1988): *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. 2. Aufl.: Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates.
- Colbert, Robert A. (2004): The immunobiology of HLA-B27: variations on a theme. In: *Curr Mol Med* 4 (1), S. 21–30.
- Cooley, Sarah; Xiao, Feng; Pitt, Michelle; Gleason, Michelle; McCullar, Valarie; Bergemann, Tracy L. et al. (2007): A subpopulation of human peripheral blood NK cells that lacks inhibitory receptors for self-MHC is developmentally immature. In: *Blood* 110 (2), S. 578–586. DOI: 10.1182/blood-2006-07-036228.
- Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A. (2001a): The biology of human natural killer-cell subsets. In: *Trends Immunol* 22 (11), S. 633–640.
- Cooper, M. A.; Fehniger, T. A.; Turner, S. C.; Chen, K. S.; Ghaheri, B. A.; Ghayur, T. et al. (2001b): Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. In: *Blood* 97 (10), S. 3146–3151.
- Cooper, Megan A.; Bush, Jennifer E.; Fehniger, Todd A.; VanDeusen, Jeffrey B.; Waite, Ross E.; Liu, Yang et al. (2002): In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. In: *Blood* 100 (10), S. 3633–3638. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0293.
- Cosman, D.; Mullberg, J.; Sutherland, C. L.; Chin, W.; Armitage, R.; Fanslow, W. et al. (2001): ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. In: *Immunity* 14 (2), S. 123–133.
- David-Watine, Brigitte; Israël, Alain; Kourilsky, Philippe (1990): The regulation and expression of MHC class I genes. In: *Immunology Today* 11 (0), S. 286–292. DOI: 10.1016/0167-5699(90)90114-O.
- de la Salle, H.; Hanau, D.; Fricker, D.; Urlacher, A.; Kelly, A.; Salamero, J. et al. (1994): Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. In: *Science* 265 (5169), S. 237–241.
- Elliott, J. M.; Wahle, J. A.; Yokoyama, W. M. (2010): MHC class I-deficient natural killer cells acquire a licensed phenotype after transfer into an MHC class I-sufficient environment. In: *Journal of Experimental Medicine* 207 (10), S. 2073–2079. DOI: 10.1084/jem.20100986.

- Faulkner, L.; Borysiewicz, L. K.; Man, S. (1998): The use of human leucocyte antigen class I transgenic mice to investigate human immune function. In: *Journal of Immunological Methods* 221 (1–2), S. 1–16. DOI: 10.1016/S0022-1759(98)00162-8.
- Fehniger, T. A.; Caligiuri, M. A. (2001): Interleukin 15: biology and relevance to human disease. In: *Blood* 97 (1), S. 14–32.
- Fehniger, T. A.; Shah, M. H.; Turner, M. J.; VanDeusen, J. B.; Whitman, S. P.; Cooper, M. A. et al. (1999): Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. In: *J Immunol* 162 (8), S. 4511–4520.
- Fehniger, Todd A.; Cai, Sheng F.; Cao, Xuefang; Bredemeyer, Andrew J.; Presti, Rachel M.; French, Anthony R.; Ley, Timothy J. (2007): Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. In: *Immunity* 26 (6), S. 798–811. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.04.010.
- Fehniger, Todd A.; Cooper, Megan A.; Caligiuri, Michael A. (2002): Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. In: *Cytokines in Tumor Immunity and Immunotherapy* 13 (2), S. 169–183. DOI: 10.1016/S1359-6101(01)00021-1.
- Fehniger, Todd A.; Cooper, Megan A.; Nuovo, Gerard J.; Cella, Marina; Facchetti, Fabio; Colonna, Marco; Caligiuri, Michael A. (2003): CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. In: *Blood* 101 (8), S. 3052–3057. DOI: 10.1182/blood-2002-09-2876.
- Ferlazzo, Guido; Thomas, Dolca; Lin, Shao-Lee; Goodman, Kiera; Morandi, Barbara; Muller, William A. et al. (2004): The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. In: *J Immunol* 172 (3), S. 1455–1462.
- Ferlazzo, Guido; Tsang, Ming L.; Moretta, Lorenzo; Melioli, Giovanni; Steinman, Ralph M.; Munz, Christian (2002): Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. In: *J Exp Med* 195 (3), S. 343–351.
- Fernandez, Nadine C.; Treiner, Emmanuel; Vance, Russell E.; Jamieson, Amanda M.; Lemieux, Suzanne; Raulet, David H. (2005): A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. In: *Blood* 105 (11), S. 4416–4423. DOI: 10.1182/blood-2004-08-3156.
- Freud, Aharon G.; Caligiuri, Michael A. (2006): Human natural killer cell development. In: *Immunol Rev* 214, S. 56–72. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x.
- Furukawa, H.; Yabe, T.; Watanabe, K.; Miyamoto, R.; Miki, A.; Akaza, T. et al. (1999): Tolerance of NK and LAK activity for HLA class I-deficient targets in a TAP1-deficient patient (bare lymphocyte syndrome type I). In: *Hum Immunol* 60 (1), S. 32–40.
- Garrido, F.; Ruiz-Cabello, F.; Cabrera, T.; Perez-Villar, J. J.; Lopez-Botet, M.; Duggan-Keen, M.; Stern, P. L. (1997): Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. In: *Immunol Today* 18 (2), S. 89–95.

Giri, J. G.; Kumaki, S.; Ahdieh, M.; Friend, D. J.; Loomis, A.; Shanebeck, K. et al. (1995): Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the alpha chain of the IL-2 receptor. In: *EMBO J* 14 (15), S. 3654–3663.

Grabstein, K. H.; Eisenman, J.; Shanebeck, K.; Rauch, C.; Srinivasan, S.; Fung, V. et al. (1994): Cloning of a T cell growth factor that interacts with the beta chain of the interleukin-2 receptor. In: *Science* 264 (5161), S. 965–968.

Greiner, D. L.; Hesselton, R. A.; Shultz, L. D. (1998): SCID mouse models of human stem cell engraftment. In: *Stem Cells* 16 (3), S. 166–177. DOI: 10.1002/stem.160166.

Huntington, Nicholas D.; Legrand, Nicolas; Alves, Nuno L.; Jaron, Barbara; Weijer, Kees; Plet, Ariane et al. (2009): IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. In: *J Exp Med* 206 (1), S. 25–34. DOI: 10.1084/jem.20082013.

Huntington, Nicholas D.; Vosshenrich, Christian A J; Di Santo, James P (2007): Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. In: *Nat Rev Immunol* 7 (9), S. 703–714. DOI: 10.1038/nri2154.

Inngjerdigen, M.; Damaj, B.; Maghazachi, A. A. (2001): Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. In: *Blood* 97 (2), S. 367–375.

Ito, Mamoru; Hiramatsu, Hidefumi; Kobayashi, Kimio; Suzue, Kazutomo; Kawahata, Mariko; Hioki, Kyoji et al. (2002): NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. In: *Blood* 100 (9), S. 3175–3182. DOI: 10.1182/blood-2001-12-0207.

Jacobs, R.; Hintzen, G.; Kemper, A.; Beul, K.; Kempf, S.; Behrens, G. et al. (2001): CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. In: *Eur J Immunol* 31 (10), S. 3121–3127. DOI: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<3121::AID-IMMU3121>3.0.CO;2-4.

Johansson, Sofia; Johansson, Maria; Rosmaraki, Eleftheria; Vahlne, Gustaf; Mehr, Ramit; Salmon-Divon, Mali et al. (2005): Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. In: *J Exp Med* 201 (7), S. 1145–1155. DOI: 10.1084/jem.20050167.

Joncker, N. T.; Shifrin, N.; Delebecque, F.; Raulet, D. H. (2010): Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. In: *Journal of Experimental Medicine* 207 (10), S. 2065–2072. DOI: 10.1084/jem.20100570.

Joncker, Nathalie T.; Fernandez, Nadine C.; Treiner, Emmanuel; Vivier, Eric; Raulet, David H. (2009): NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model. In: *J Immunol* 182 (8), S. 4572–4580. DOI: 10.4049/jimmunol.0803900.

Karlhofer, F. M.; Ribaldo, R. K.; Yokoyama, W. M. (1992): MHC class I alloantigen specificity of Ly-49+ IL-2-activated natural killer cells. In: *Nature* 358 (6381), S. 66–70. DOI: 10.1038/358066a0.

Kataoka, S.; Satoh, J.; Fujiya, H.; Toyota, T.; Suzuki, R.; Itoh, K.; Kumagai, K. (1983): Immunologic aspects of the nonobese diabetic (NOD) mouse. Abnormalities of cellular immunity. In: *Diabetes* 32 (3), S. 247–253.

Kennedy, M. K.; Glaccum, M.; Brown, S. N.; Butz, E. A.; Viney, J. L.; Embers, M. et al. (2000): Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. In: *J Exp Med* 191 (5), S. 771–780.

Kenneth Murphy (2012): Janeway's Immunobiology. 8th edition: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC.

Keppel, Molly P.; Saucier, Nermina; Mah, Annelise Y.; Vogel, Tiphonie P.; Cooper, Megan A. (2015): Activation-Specific Metabolic Requirements for NK Cell IFN-gamma Production. In: *J Immunol* 194 (4), S. 1954–1962. DOI: 10.4049/jimmunol.1402099.

Kim, Sungjin; Poursine-Laurent, Jennifer; Truscott, Steven M.; Lybarger, Lonnie; Song, Yun-Jeong; Yang, Liping et al. (2005): Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. In: *Nature* 436 (7051), S. 709–713. DOI: 10.1038/nature03847.

Kim, Sungjin; Sunwoo, John B.; Yang, Liping; Choi, Taewoong; Song, Yun-Jeong; French, Anthony R. et al. (2008): HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (8), S. 3053–3058. DOI: 10.1073/pnas.0712229105.

Lanier, L. L. (2001): Face off--the interplay between activating and inhibitory immune receptors. In: *Curr Opin Immunol* 13 (3), S. 326–331.

Lanier, L. L.; Le, A. M.; Civin, C. I.; Loken, M. R.; 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. In: *J Immunol* 136 (12), S. 4480–4486.

Lanier, L. L.; Testi, R.; Bindl, J.; Phillips, J. H. (1989): Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule. In: *J Exp Med* 169 (6), S. 2233–2238.

Lapidot, T.; Pflumio, F.; Doedens, M.; Murdoch, B.; Williams, D. E.; Dick, J. E. (1992): Cytokine stimulation of multilineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. In: *Science* 255 (5048), S. 1137–1141.

Leclercq, G.; Debacker, V.; Smedt, M. de; Plum, J. (1996): Differential effects of interleukin-15 and interleukin-2 on differentiation of bipotential T/natural killer progenitor cells. In: *J Exp Med* 184 (2), S. 325–336.

Lee, Gilbert Aaron; Liou, Yae-Huei; Wang, Szu-Wen; Ko, Kai-Liang; Jiang, Si-Tse; Liao, Nan-Shih (2011): Different NK cell developmental events require different levels of IL-15 trans-presentation. In: *J Immunol* 187 (3), S. 1212–1221. DOI: 10.4049/jimmunol.1100331.

Ljunggren, Hans-Gustaf; Malmberg, Karl-Johan (2007): Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. In: *Nature Reviews Immunology* 7 (5), S. 329–339. Online verfügbar unter <http://www.redi->

bw.de/db/ebsco.php/search.ebscohost.com/login.aspx%3fdirect%3dtrue%26db%3dap  
h%26AN%3d24823847%26site%3dehost-live.

Lodolce, J. P.; Boone, D. L.; Chai, S.; Swain, R. E.; Dassopoulos, T.; Trettin, S.; Ma, A. (1998): IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. In: *Immunity* 9 (5), S. 669–676.

Long, E. O. (1999): Regulation of immune responses through inhibitory receptors. In: *Annu Rev Immunol* 17, S. 875–904. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.875.

Lozzio, B. B.; Lozzio, C. B. (1979): Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. In: *Leuk Res* 3 (6), S. 363–370.

Marks-Konczalik, J.; Dubois, S.; Losi, J. M.; Sabzevari, H.; Yamada, N.; Feigenbaum, L. et al. (2000): IL-2-induced activation-induced cell death is inhibited in IL-15 transgenic mice. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (21), S. 11445–11450. DOI: 10.1073/pnas.200363097.

Meazza, Raffaella; Azzarone, Bruno; Orengo, Anna Maria; Ferrini, Silvano (2011): Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. In: *J Biomed Biotechnol* 2011, S. 861920. DOI: 10.1155/2011/861920.

Michaud, Annie; Dardari, R'Kia; Charrier, Emily; Cordeiro, Paulo; Herblot, Sabine; Duval, Michel (2010): IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. In: *J Immunother* 33 (4), S. 382–390. DOI: 10.1097/CJI.0b013e3181cd872d.

Miller, J. S.; Alley, K. A.; McGlave, P. (1994): Differentiation of natural killer (NK) cells from human primitive marrow progenitors in a stroma-based long-term culture system: identification of a CD34+7+ NK progenitor. In: *Blood* 83 (9), S. 2594–2601.

Miller, J. S.; McCullar, V. (2001): Human natural killer cells with polyclonal lectin and immunoglobulinlike receptors develop from single hematopoietic stem cells with preferential expression of NKG2A and KIR2DL2/L3/S2. In: *Blood* 98 (3), S. 705–713.

Miller, J. S.; Verfaillie, C.; McGlave, P. (1992): The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture. In: *Blood* 80 (9), S. 2182–2187.

Miller, Jeffrey S.; Rooney, Cliona M.; Curtsinger, Julie; McElmurry, Ron; McCullar, Valarie; Verneris, Michael R. et al. (2014): Expansion and homing of adoptively transferred human natural killer cells in immunodeficient mice varies with product preparation and in vivo cytokine administration: implications for clinical therapy. In: *Biol Blood Marrow Transplant* 20 (8), S. 1252–1257. DOI: 10.1016/j.bbmt.2014.05.004.

Mishra, Anjali; Sullivan, Laura; Caligiuri, Michael A. (2014): Molecular pathways: interleukin-15 signaling in health and in cancer. In: *Clin Cancer Res* 20 (8), S. 2044–2050. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3603.

Mombaerts, P.; Iacomini, J.; Johnson, R. S.; Herrup, K.; Tonegawa, S.; Papaioannou, V. E. (1992): RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. In: *Cell* 68 (5), S. 869–877.

- Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Biassoni, R.; Mingari, M. C.; Moretta, L. (1996): Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. In: *Annu Rev Immunol* 14, S. 619–648. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.619.
- Moretta, A.; Bottino, C.; Vitale, M.; Pende, D.; Cantoni, C.; Mingari, M. C. et al. (2001): Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. In: *Annu Rev Immunol* 19, S. 197–223. DOI: 10.1146/annurev.immunol.19.1.197.
- Moretta, A.; Marcenaro, E.; Parolini, S.; Ferlazzo, G.; Moretta, L. (2008): NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. In: *Cell Death Differ* 15 (2), S. 226–233. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402170.
- Moretta, Alessandro (2002): Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. In: *Nat Rev Immunol* 2 (12), S. 957–964. DOI: 10.1038/nri956.
- Moretta, L.; Montaldo, E.; Vacca, P.; Del Zotto, G.; Moretta, F.; Merli, P. et al. (2014): Human Natural Killer Cells: Origin, Receptors, Function, and Clinical Applications. In: *Int Arch Allergy Immunol* 164 (4), S. 253–264. Online verfügbar unter <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000365632>.
- Mrozek, E.; Anderson, P.; Caligiuri, M. A. (1996): Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. In: *Blood* 87 (7), S. 2632–2640.
- O’Shea, J. J.; Weissman, A. M.; Kennedy, I. C.; Ortaldo, J. R. (1991): Engagement of the natural killer cell IgG Fc receptor results in tyrosine phosphorylation of the zeta chain. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (2), S. 350–354.
- Parham, Peter (2005): MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. In: *Nat Rev Immunol* 5 (3), S. 201–214. DOI: 10.1038/nri1570.
- Pende, D.; Parolini, S.; Pessino, A.; Sivori, S.; Augugliaro, R.; Morelli, L. et al. (1999): Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. In: *J Exp Med* 190 (10), S. 1505–1516.
- Pfeiffer, Matthias; Schumm, Michael; Feuchtinger, Tobias; Dietz, Klaus; Handgretinger, Rupert; Lang, Peter (2007): Intensity of HLA class I expression and KIR-mismatch determine NK-cell mediated lysis of leukaemic blasts from children with acute lymphatic leukaemia. In: *British journal of haematology* 138 (1), S. 97–100. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2007.06631.x.
- Pillet, Anne-Hélène; Thèze, Jacques; Rose, Thierry (2011): Interleukin (IL)-2 and IL-15 have different effects on human natural killer lymphocytes. In: *Human Immunology* 72 (11), S. 1013–1017. DOI: 10.1016/j.humimm.2011.07.311.
- Prlic, Martin; Blazar, Bruce R.; Farrar, Michael A.; Jameson, Stephen C. (2003): In vivo survival and homeostatic proliferation of natural killer cells. In: *J Exp Med* 197 (8), S. 967–976. DOI: 10.1084/jem.20021847.

- Ranson, Thomas; Vosshenrich, Christian A J; Corcuff, Erwan; Richard, Odile; Muller, Werner; Di Santo, James P (2003): IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. In: *Blood* 101 (12), S. 4887–4893. DOI: 10.1182/blood-2002-11-3392.
- Raulet, David H. (2004): Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. In: *Nat Immunol* 5 (10), S. 996–1002. DOI: 10.1038/ni1114.
- Raulet, David H.; Vance, Russell E. (2006): Self-tolerance of natural killer cells. In: *Nat Rev Immunol* 6 (7), S. 520–531. DOI: 10.1038/nri1863.
- Rham, Casimir de; Ferrari-Lacraz, Sylvie; Jendly, Sabrina; Schneiter, Gregory; Dayer, Jean-Michel; Villard, Jean (2007): The proinflammatory cytokines IL-2, IL-15 and IL-21 modulate the repertoire of mature human natural killer cell receptors. In: *Arthritis Res Ther* 9 (6), S. R125. DOI: 10.1186/ar2336.
- Robertson, M. J.; Ritz, J. (1990): Biology and clinical relevance of human natural killer cells. In: *Blood* 76 (12), S. 2421–2438.
- Rochman, Yrina; Spolski, Rosanne; Leonard, Warren J. (2009): New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. In: *Nat Rev Immunol* 9 (7), S. 480–490. DOI: 10.1038/nri2580.
- Romagnani, Chiara; Juelke, Kerstin; Falco, Michela; Morandi, Barbara; D'Agostino, Antonella; Costa, Roberta et al. (2007): CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. In: *J Immunol* 178 (8), S. 4947–4955.
- Rubinstein, Mark P.; Kovar, Marek; Purton, Jared F.; Cho, Jae-Ho; Boyman, Onur; Surh, Charles D.; Sprent, Jonathan (2006): Converting IL-15 to a superagonist by binding to soluble IL-15R{alpha}. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (24), S. 9166–9171. DOI: 10.1073/pnas.0600240103.
- Ruggeri, L.; Capanni, M.; Casucci, M.; Volpi, I.; Tosti, A.; Perruccio, K. et al. (1999): Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. In: *Blood* 94 (1), S. 333–339.
- Ruggeri, L.; Capanni, M.; Martelli, M. F.; Velardi, A. (2001): Cellular therapy: exploiting NK cell alloreactivity in transplantation. In: *Curr Opin Hematol* 8 (6), S. 355–359.
- Ruggeri, Loredana; Capanni, Marusca; Urbani, Elena; Perruccio, Katia; Shlomchik, Warren D.; Tosti, Antonella et al. (2002): Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. In: *Science* 295 (5562), S. 2097–2100. DOI: 10.1126/science.1068440.
- Schönberg, Kathrin; Sribar, Martina; Enczmann, Jürgen; Fischer, Johannes C.; Uhrberg, Markus (2011): Analyses of HLA-C-specific KIR repertoires in donors with group A and B haplotypes suggest a ligand-instructed model of NK cell receptor acquisition. In: *Blood* 117 (1), S. 98–107. DOI: 10.1182/blood-2010-03-273656.
- Serreze, D. V.; Leiter, E. H. (1988): Defective activation of T suppressor cell function in nonobese diabetic mice. Potential relation to cytokine deficiencies. In: *J Immunol* 140 (11), S. 3801–3807.

- Shinkai, Y.; Rathbun, G.; Lam, K. P.; Oltz, E. M.; Stewart, V.; Mendelsohn, M. et al. (1992): RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. In: *Cell* 68 (5), S. 855–867.
- Shultz, L. D.; Schweitzer, P. A.; Christianson, S. W.; Gott, B.; Schweitzer, I. B.; Tennent, B. et al. (1995): Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. In: *J Immunol* 154 (1), S. 180–191.
- Shultz, Leonard D.; Ishikawa, Fumihiko; Greiner, Dale L. (2007): Humanized mice in translational biomedical research. In: *Nature Reviews Immunology* 7 (2), S. 118–130. Online verfügbar unter <http://www.redi-bw.de/db/ebsco.php/search.ebscohost.com/login.aspx%3fdirect%3dtrue%26db%3dap%26AN%3d23839757%26site%3dehost-live>.
- Shultz, Leonard D.; Lyons, Bonnie L.; Burzenski, Lisa M.; Gott, Bruce; Chen, Xiaohua; Chaleff, Stanley et al. (2005): Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. In: *J Immunol* 174 (10), S. 6477–6489.
- Sivori, S.; Pende, D.; Bottino, C.; Marcenaro, E.; Pessino, A.; Biassoni, R. et al. (1999): NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. In: *Eur J Immunol* 29 (5), S. 1656–1666. DOI: 10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1656::AID-IMMU1656>2.0.CO;2-1.
- Sivori, S.; Vitale, M.; Morelli, L.; Sanseverino, L.; Augugliaro, R.; Bottino, C. et al. (1997): p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. In: *J Exp Med* 186 (7), S. 1129–1136.
- Sleiman, Marwan; Brons, Nicolaas H C; Kaoma, Tony; Dogu, Figen; Villa-Forte, Alexandra; Lenoble, Patrick et al. (2014): NK cell killer Ig-like receptor repertoire acquisition and maturation are strongly modulated by HLA class I molecules. In: *J Immunol* 192 (6), S. 2602–2610. DOI: 10.4049/jimmunol.1302843.
- Stoklasek, Thomas A.; Schluns, Kimberly S.; Lefrancois, Leo (2006): Combined IL-15/IL-15Ralpha immunotherapy maximizes IL-15 activity in vivo. In: *J Immunol* 177 (9), S. 6072–6080.
- Sugamura, K.; Asao, H.; Kondo, M.; Tanaka, N.; Ishii, N.; Ohbo, K. et al. (1996): The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. In: *Annu Rev Immunol* 14, S. 179–205. DOI: 10.1146/annurev.immunol.14.1.179.
- The Jackson Laboratory (Hg.) (2015): NOD.Cg-Rag1tm1Mom Il2rgtm1Wjl/SzJ. JAX® Mice database. Online verfügbar unter <http://jaxmice.jax.org/strain/017914.html>.
- Trowsdale, J. (2001): Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. In: *Immunity* 15 (3), S. 363–374.

- Tschopp, J.; Nabholz, M. (1990): Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic T lymphocytes. In: *Annu Rev Immunol* 8, S. 279–302. DOI: 10.1146/annurev.iy.08.040190.001431.
- Valiante, N. M.; Uhrberg, M.; Shilling, H. G.; Lienert-Weidenbach, K.; Arnett, K. L.; D'Andrea, A. et al. (1997): Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. In: *Immunity* 7 (6), S. 739–751.
- Vitale, M.; Bottino, C.; Sivori, S.; Sanseverino, L.; Castriconi, R.; Marcenaro, E. et al. (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. In: *J Exp Med* 187 (12), S. 2065–2072.
- Vivier, Eric; Tomasello, Elena; Baratin, Myriam; Walzer, Thierry; Ugolini, Sophie (2008): Functions of natural killer cells. In: *Nat Immunol* 9 (5), S. 503–510. DOI: 10.1038/ni1582.
- Waldmann, T. A.; Dubois, S.; Tagaya, Y. (2001): Contrasting roles of IL-2 and IL-15 in the life and death of lymphocytes: implications for immunotherapy. In: *Immunity* 14 (2), S. 105–110.
- Waldmann, T. A.; Tagaya, Y. (1999): The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. In: *Annu Rev Immunol* 17, S. 19–49. DOI: 10.1146/annurev.immunol.17.1.19.
- Waldmann, Thomas A. (2006): The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design. In: *Nat Rev Immunol* 6 (8), S. 595–601. DOI: 10.1038/nri1901.
- Woiterski, Jeanette; Ebinger, Martin; Witte, Kai E.; Goecke, Barbara; Heininger, Vanessa; Philippek, Martin et al. (2013): Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2R $\gamma$  null mice reflects individual leukemogenicity and highly correlates with clinical outcome. In: *Int J Cancer* 133 (7), S. 1547–1556. DOI: 10.1002/ijc.28170.
- Wright, S. C.; Bonavida, B. (1987): Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. VII. functional comparison of human natural killer cytotoxic factors with recombinant lymphotoxin and tumor necrosis factor. In: *J Immunol* 138 (6), S. 1791–1798.
- Wu, J.; Song, Y.; Bakker, A. B.; Bauer, S.; Spies, T.; Lanier, L. L.; Phillips, J. H. (1999): An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. In: *Science* 285 (5428), S. 730–732.
- Yawata, Makoto; Yawata, Nobuyo; Draghi, Monia; Little, Ann-Margaret; Partheniou, Fotini; Parham, Peter (2006): Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function. In: *J Exp Med* 203 (3), S. 633–645. DOI: 10.1084/jem.20051884.

- Yawata, Makoto; Yawata, Nobuyo; Draghi, Monia; Partheniou, Fotini; Little, Ann-Margaret; Parham, Peter (2008): MHC class I-specific inhibitory receptors and their ligands structure diverse human NK-cell repertoires toward a balance of missing self-response. In: *Blood* 112 (6), S. 2369–2380. DOI: 10.1182/blood-2008-03-143727.
- Yokoyama, W. M. (1998): Natural killer cell receptors. In: *Curr Opin Immunol* 10 (3), S. 298–305.
- Yokoyama, Wayne M. (1995): Natural killer cell receptors. In: *Current Opinion in Immunology* 7 (1), S. 110–120. DOI: 10.1016/0952-7915(95)80036-0.
- Yokoyama, Wayne M.; Kim, Sungjin (2006): How do natural killer cells find self to achieve tolerance? In: *Immunity* 24 (3), S. 249–257. DOI: 10.1016/j.immuni.2006.03.006.
- Yu, H.; Fehniger, T. A.; Fuchshuber, P.; Thiel, K. S.; Vivier, E.; Carson, W. E.; Caligiuri, M. A. (1998): Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15. In: *Blood* 92 (10), S. 3647–3657.
- Yu, Junli; Heller, Glenn; Chewing, Joseph; Kim, Sungjin; Yokoyama, Wayne M.; Hsu, Katharine C. (2007): Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands. In: *J Immunol* 179 (9), S. 5977–5989.
- Zhang, Cai; Zhang, Jianhua; Niu, Jiafeng; Zhang, Jian; Tian, Zhigang (2008): Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. In: *Cytokine* 42 (1), S. 128–136. DOI: 10.1016/j.cyto.2008.01.003.
- Zimmer, J.; Donato, L.; Hanau, D.; Cazenave, J. P.; Tongio, M. M.; Moretta, A.; de la Salle, H (1998): Activity and phenotype of natural killer cells in peptide transporter (TAP)-deficient patients (type I bare lymphocyte syndrome). In: *J Exp Med* 187 (1), S. 117–122.

## 7 Anhang

### Tabellen und Diagramme zu den Berechnungen mit den mit <sup>A</sup> markierten Ausreißern:

**Zu: 3.1** Hat die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls einen Effekt auf die NK Zell-Frequenzen nach adoptivem Transfer humaner NK Zellen in NRG bzw. NSG Mäuse?

**Tabelle A9: Darstellung des Effektes einer IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex Gabe auf die Frequenzen „humaner“ ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zellen nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse.** Dargestellt sind die Untersuchungen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

	Maus-Nr.	ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	MW der Kontrollgruppe	Maus-Nr.	ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	Normierte ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz [ ]*
	ohne IL15			mit IL15		IL15
<b>Spender 2 (NRG)</b>	398	0,37	<b>0,42</b>	414	0,79	1,98
	370	0,28		415	1,20	2,86
	413	0,60		421	4,50 <sup>A</sup>	10,74 <sup>A</sup>
<b>Spender 3 (NSG)</b>	429	0,02	<b>0,05</b>	433	0,07 <sup>A</sup>	1,33 <sup>A</sup>
	430	0,06		434	0,77	15,66
	82	0,06		81	0,98	20,07
<b>Spender 4 (NRG)</b>	615	0,02	<b>0,04</b>	621	0,37	8,62
	560	0,06		563	0,20	4,75
<b>MW <math>\pm</math> SD**</b>		0,19 $\pm$ 0,21			1,11 $\pm$ 1,42	8,24 $\pm$ 6,87

<sup>A</sup> Ausreißer, werden bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen berücksichtigt.

\* ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen der Gruppe „mit IL15“ geteilt durch MW der Datenpunkte der Kontrollgruppe (fett gedruckt) des entsprechenden Spenders (Bsp.: normierter Wert Maus 414: 1,98=0,79/0,42)

\*\* MW bzw. SD aller ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen der entsprechenden experimentellen Gruppe bzw. der normierten Einzeldaten (gleiche Spalte, siehe oben), Berechnung mit den mit <sup>A</sup> gekennzeichneten „Ausreißer“

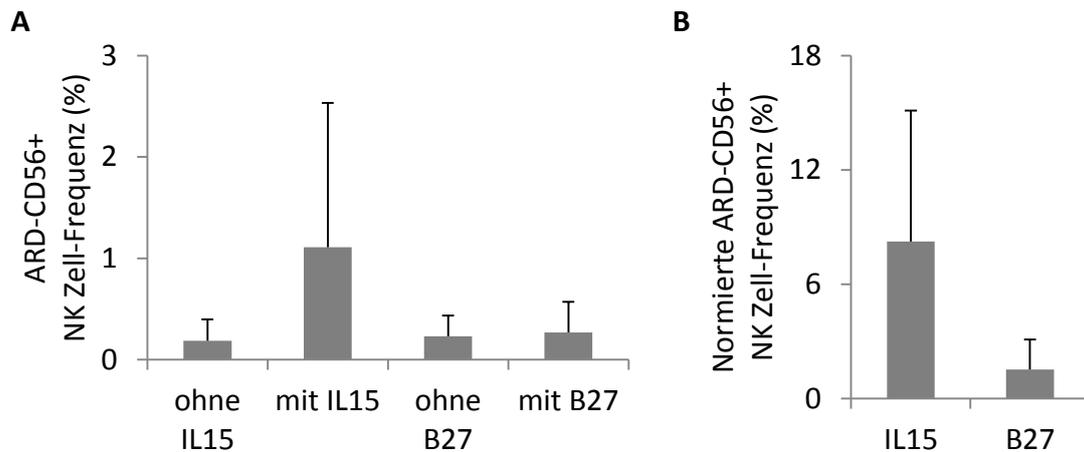
**Tabelle A10: Darstellung der Frequenzen „humaner“ ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zellen nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NRG-B27 Mäuse.** Dargestellt sind die Untersuchungen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben wurden.

	Maus-Nr.	ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	MW der Kontrollgruppe	Maus-Nr.	ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)	Normierte ARD <sup>-</sup> CD56 <sup>+</sup> NK Zell-Frequenz [ ]*
	ohne B27			mit B27		B27
<b>Spender 1 (NRG)</b>	342	0,08	<b>0,13</b>	341	0,06	0,48
	391	0,19		390	0,05	0,4
	nicht erhoben			369	0,67 <sup>A</sup>	5,03 <sup>A</sup>
<b>Spender 2 (NRG)</b>	398	0,37	<b>0,42</b>	399	0,80	1,92
	370	0,28		371	0,30	0,72
	413	0,60		372	0,12	0,28
<b>Spender 4 (NRG)</b>	615	0,02	<b>0,04</b>	616	0,09	2,11
	560	0,06		617	0,05	1,25
<b>MW ± SD**</b>		0,23 ± 0,21			0,27 ± 0,3	1,53 ± 1,58

<sup>A</sup> Ausreißer, werden bei den folgenden Berechnungen und Diagrammen berücksichtigt.

\* ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen der Gruppe „mit IL15“ geteilt durch MW der Datenpunkte der Kontrollgruppe (fett gedruckt) des entsprechenden Spenders (Bsp.: normierter Wert Maus 414: 1,98=0,79/0,42)

\*\* MW bzw. SD aller ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen der entsprechenden experimentellen Gruppe bzw. der normierten Einzeldaten (gleiche Spalte, siehe oben), Berechnung mit den mit <sup>A</sup> gekennzeichneten „Ausreißer“

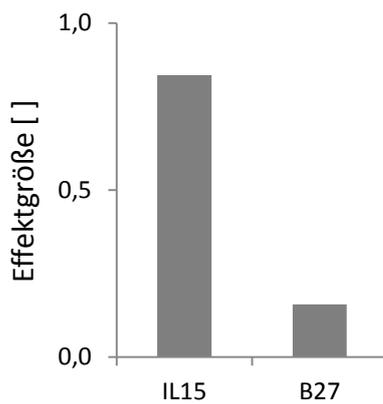


**Abbildung A9: Die Supplementation von humanem IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens erhöht die NK Zell-Frequenzen in adoptiv transferierten NRG bzw. NSG Mäusen.** Darstellung der Frequenzen der ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zellen nach AT in NRG bzw. NSG Mäusen wahlweise ohne oder mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex bzw. ohne oder in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens. (A) Mittelwerte der ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen (%). (B) Mittelwerte der normierten ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen. Dargestellt sind zusammenfassend die Analysedaten an Tag 7 bzw. 8 mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten mit Ausreißern (mit <sup>A</sup> markiert, siehe Tabelle A9 und A10). Es handelt sich um 4 unabhängige Experimente mit je n=8 Mäusen ohne bzw. mit IL15/IL15R $\alpha$ -Supplementation und n=7 Mäusen ohne bzw. n=8 Mäusen mit MHC-B27-Transgen.

**Tabelle A11: Berechnung der Effektgröße (Formel siehe 2.2.9) \***

	Spender 2, 3, 4		Spender 1, 2, 4	
	ohne IL15	mit IL15	ohne B27	mit B27
<b>MW ARD<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenz (%)</b>	0,19	1,11	0,23	0,27
<b>SD alle Werte Gruppe und Kontrollgruppe (%)</b>	0,39		0,23	
<b>Effektgröße [ ]</b>	IL15	0,84	B27	0,16

\* Berechnung mit den in Tabelle A9 und A10 mit <sup>A</sup> markierten Ausreißern



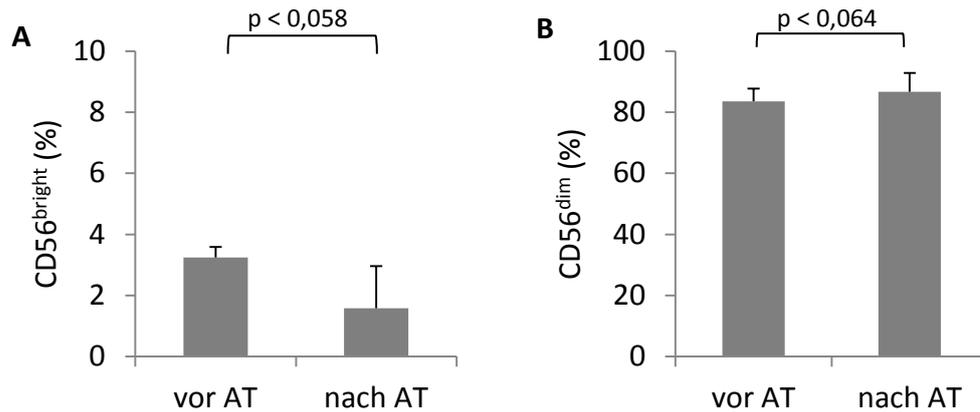
**Abbildung A10: Die Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex erhöht die NK Zell-Frequenzen in adoptiv transferierten NRG bzw. NSG Mäusen.** Darstellung der Effektgröße der Supplementation von IL15 bzw. der Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens auf die ARD<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK Zell-Frequenzen in NRG bzw. NSG Mäusen (siehe Tabelle A11). Es handelt sich um 4 unabhängige Experimente mit je n=8 Mäusen ohne bzw. mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation und n=7 Mäusen ohne bzw. n=8 Mäusen mit MHC-B27-Transgen.

**Zu: 3.2** Wie verhalten sich die Frequenzen der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse?

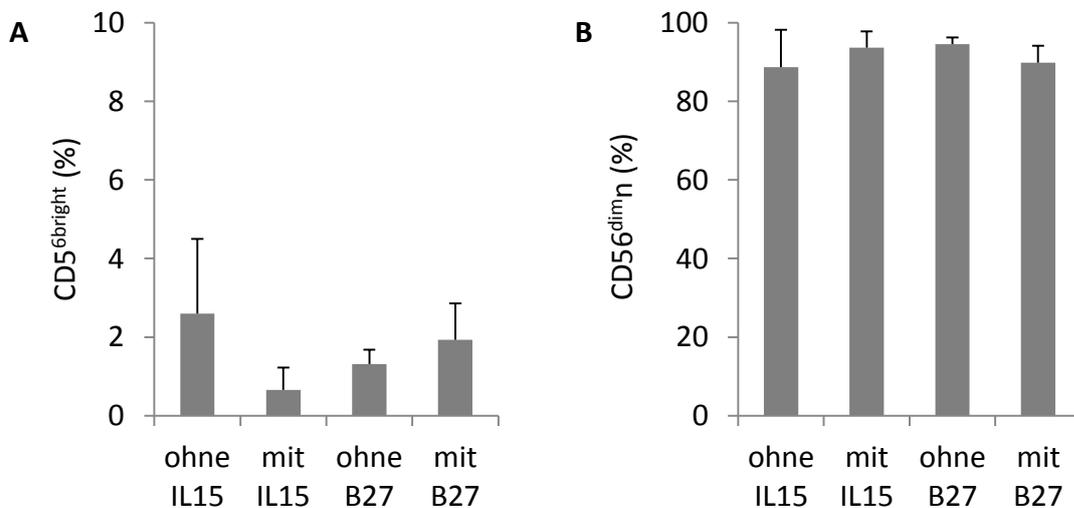
**Tabelle A13: Die Mittelwerte der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Frequenzen unterscheiden sich vor und nach adoptivem Transfer (AT) in NRG bzw. NSG Mäuse.** Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), die aus den Werten aus Tabelle 12 berechnet wurden.

Frequenz (%)	Gesamt	CD56 bright	CD56 dim	nach AT	CD56 bright	CD56 dim	CD56 bright	CD56 dim
		vor AT			ohne IL15		mit IL15	
MW $\pm$ SD*		3,2 $\pm$ 0,3	83,6 $\pm$ 4,2		2,6 $\pm$ 1,9	88,7 $\pm$ 9,5	0,7 $\pm$ 0,6	93,6 $\pm$ 4,1
	nach AT		ohne B27		mit B27			
MW $\pm$ SD*		1,6 $\pm$ 1,4	86,7 $\pm$ 6,2		1,3 $\pm$ 0,4	94,6 $\pm$ 1,7	1,9 $\pm$ 0,9	89,9 $\pm$ 4,2

\* MW bzw. SD der Frequenzen an CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen vor und nach AT, Berechnung mit den mit A gekennzeichneten „Ausreißern“.



**Abbildung A12: Die Frequenzen der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen unterscheiden sich vor und nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse.** Darstellung der Frequenzen der (A) CD56<sup>bright</sup> und (B) CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen der humanen Proben vor AT an Tag 0 und nach adoptivem Transfer aus den Mäusen an Tag 7 bzw. 8. Dargestellt sind die Analysedaten mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten mit Ausreißern (mit <sup>A</sup> markiert, siehe auch Tabelle 12 und 13). Es handelt sich um 3 unabhängige Experimente mit n=3 humanen Proben vor AT und n=19 Datenpunkten nach AT.



**Abbildung A13: Der Anteil an CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen unterscheidet sich nach adoptivem Transfer nicht signifikant in den verschiedenen Mausgruppen.** Darstellung der Frequenzen der (A) CD56<sup>bright</sup> und (B) CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäusen wahlweise ohne oder mit Supplementation von IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex bzw. ohne oder in Gegenwart des humanen MHC-B27-Transgens. Dargestellt sind die Analysedaten mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten mit Ausreißern (mit <sup>A</sup> markiert, siehe Tabelle 12 und 13). Es handelt sich um 3 unabhängige Experimente mit n=5 Mäusen ohne bzw. n=6 Mäusen mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation und n=5 Mäusen ohne bzw. n=6 Mäusen mit MHC-B27-Transgen.

**Zu: 3.3** Hat die Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex oder die Gegenwart eines menschlichen MHC-Moleküls einen Effekt auf die Expression der NK Zell-Rezeptoren nach AT in NRG bzw. NSG Mäuse?

**Tabelle A19: Darstellung der Mittelwerte der Expressionen der NK Zell-Rezeptoren der Proben nach AT normiert zur Kontrolle vor AT.** Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD), die aus den zur Kontrolle vor AT normierten Daten nach AT aus Tabelle 16 und 17 berechnet wurden.

		Expression nach AT normiert zur Kontrolle vor AT [ ]			
		ohne IL15	mit IL15	ohne B27	mit B27
MW ± SD*	KIR+	1,17 ± 0,28	1,04 ± 0,08	1,23 ± 0,22	1,16 ± 0,19
	NKG2A+	0,86 ± 0,19	1,07 ± 0,13	1,03 ± 0,35	1,03 ± 0,3
	NKG2D+	0,95 ± 0,12	1,05 ± 0,12	0,99 ± 0,13	1,0 ± 0,06
	NKp44+	3,11 ± 7,02	0,91 ± 0,91	3,80 ± 7,33	2,25 ± 3,0

\* MW bzw. SD der NK Zell-Rezeptor-Expressionen nach AT normiert zur Kontrolle vor AT, Berechnung mit den mit <sup>A</sup> gekennzeichneten Daten von Maus-Nr. 82 in Tabelle 16.

**Tabelle A20: Darstellung der Mittelwerte der NK Zell-Rezeptor-Expression der Kontrollgruppen ohne Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex bzw. ohne MHC-B27-Transgen.** Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) der Datenpunkte ohne IL15 bzw. ohne MHC-B27-Transgen aus Tabelle 14 bzw. 15. Diese wurden an 4 Spendern in 4 verschiedenen Experimenten erhoben.

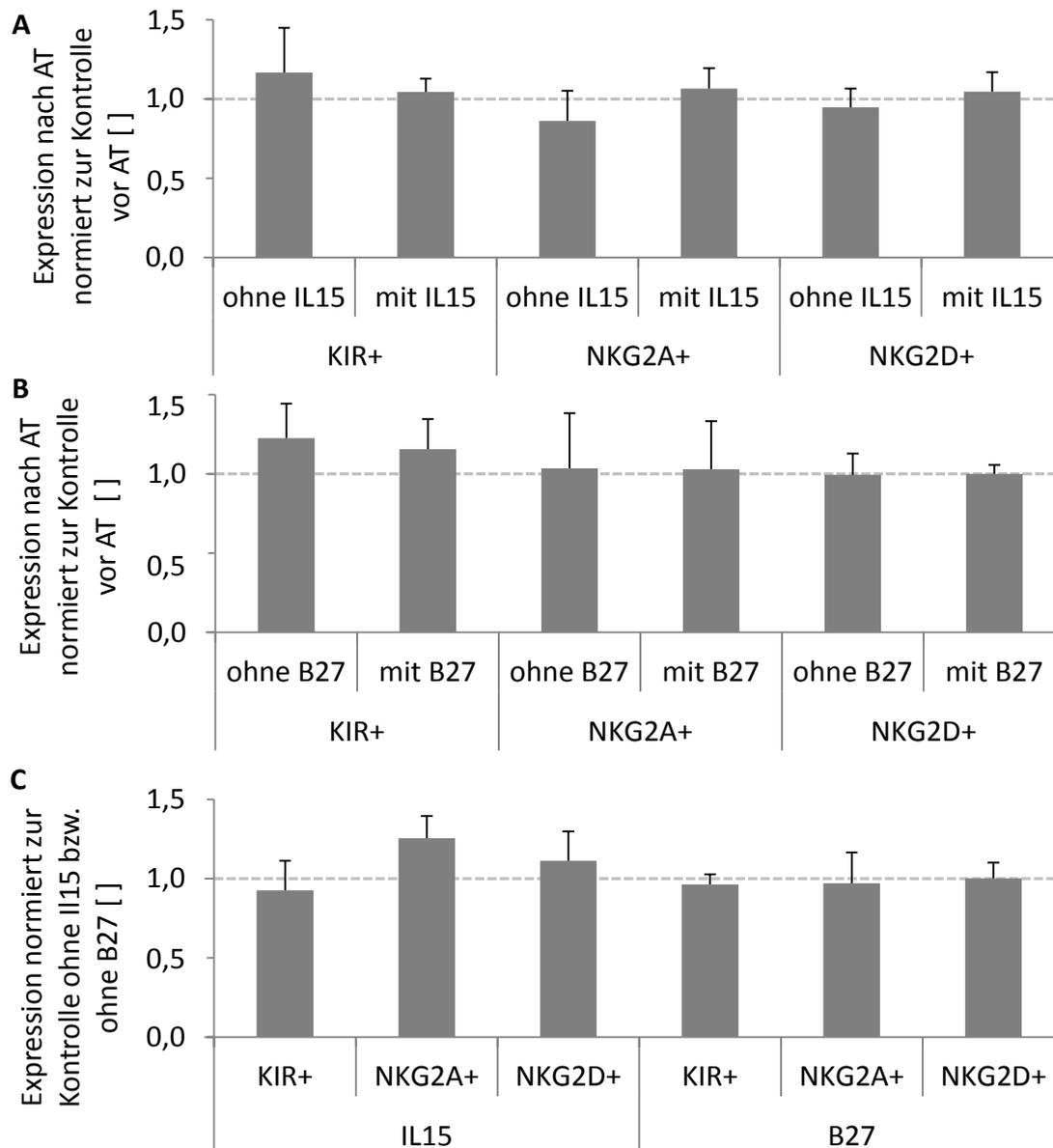
MW der Rezeptor-Expression (%)	ohne IL15			ohne B27		
	Spender 2 (NRG)	Spender 3 (NSG)	Spender 4 (NRG)	Spender 1 (NRG)	Spender 2 (NRG)	Spender 4 (NRG)
KIR+	65,2	38,3	56,8	59,7	65,2	56,8
NKG2A+	27,9	45,8	47,2	31,0	27,9	47,2
NKG2D+	95,5	86,7	62,1	94,5	95,5	62,1
NKp44+	0,3	0,0	15,3	1,4	0,3	15,3

\* MW der NK Zell-Rezeptor-Expressionen der Kontrollgruppen nach AT, Berechnung mit den mit <sup>A</sup> gekennzeichneten Daten von Maus-Nr. 82 in Tabelle 14.

**Tabelle A21: Darstellung der NK Zell-Rezeptor-Expression der Proben mit Supplementation von IL15/IL15R $\alpha$ -Komplex normiert zur Kontrollgruppe.** Dargestellt sind die zur Kontrollgruppe normierten NK Zell-Rezeptor-Expressionen inklusive Mittelwert (MW) und Standardabweichungen (SD), welche aus den Werten aus Tabelle 14 und 20 berechnet wurden. Diese wurden an 3 Spendern in 3 verschiedenen Experimenten erhoben (n.b. – nicht berechenbar).

Gruppe mit IL15	Maus-Nr.	Expression normiert zur Kontrollgruppe ohne IL15 [ ]*			
		KIR+	NKG2A+	NKG2D+	NKp44+
Spender 2 (NRG)	414	0,7	1,4	1,0	1,1
	415	0,7	1,4	1,0	0,8
	421	0,7	1,4	1,0	0,4
Spender 3 (NSG)	433	1,0	1,1	0,9	n.b.
	434	1,1	1,2	1,1	n.b.
	81	1,2	1,2	1,1	n.b.
Spender 4 (NRG)	621	0,9	1,1	1,3	0,1
	563	1,1	1,2	1,5	0,2
<b>MW <math>\pm</math> SD</b>	-	0,93 $\pm$ 0,19	1,25 $\pm$ 0,14	1,11 $\pm$ 0,19	n.b.

\* Rezeptor-Expression der Datenpunkte mit IL15 aus Tabelle 14 geteilt durch den Mittelwert der Proben ohne IL15 des entsprechenden Spenders aus Tabelle 20, der mit den mit <sup>A</sup> markierten Daten von Maus-Nr. 82 berechnet wurde (Bsp.: normierter Wert Maus 414: 0,7=45,8/65,2).



**Abbildung A15: Die Supplementation von humanem IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex, nicht aber die Präsenz des MHC-B27-Transgens zeigt einen kleinen Effekt auf die Expression der KIRs und des NKG2A- und NKG2D-Rezeptors auf humanen NK Zellen nach AT in NRG bzw. NSG Mäusen.** Darstellung ausgewählter NK Zell-Rezeptoren auf NK Zellen nach adoptivem Transfer in NRG bzw. NSG Mäuse, welche wahlweise ohne oder mit IL15/IL15 $\alpha$ -Komplex supplementiert wurden bzw. wahlweise das humane MHC-B27-Transgen exprimierten. Dargestellt sind die Daten nach AT normiert zur Kontrolle vor AT (A und B) und die Daten mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation bzw. in Gegenwart des MHC-B27-Transgens normiert zur Kontrollgruppe (C). Zusammenfassend sind die Analysedaten an Tag 7 bzw. 8 mit Mittelwerten und Standardabweichungen der Originaldaten mit den Ausreißern (mit <sup>A</sup> markiert, siehe Tabelle A19, A21 und A22) dargestellt. Es handelt sich um 4 unabhängige Experimente mit je n=8 Mäusen ohne bzw. mit IL15/IL15 $\alpha$ -Supplementation und n=7 Mäusen ohne bzw. n=8 Mäusen in Gegenwart des MHC-B27-Transgen.

## **8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Konzeption der Versuche erfolgte durch Dr. med. Dr. rer. nat. Maya André (Arbeitsgruppenleiterin und Betreuerin der Dissertationsschrift) und Aylene Kübler (Naturwissenschaftliche Doktorandin in der Arbeitsgruppe).

Sämtliche Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Aylene Kübler) von mir in Zusammenarbeit oder mit Unterstützung durch Aylene Kübler, Dr. rer. nat. Jeanette Woiterski, Max Rentschler oder Barbara Goecke (MTA der Arbeitsgruppe) durchgeführt.

Die Auswertung der Experimente und die Statistik erfolgte in Zusammenarbeit mit Dr. med. Dr. rer. nat. Maya André und Aylene Kübler und eigenständig nach Anleitung durch die zuletzt genannten Personen.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Dr. med. Dr. rer. nat. Maya André verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Friedrichshafen, den 15.10.15

Dorothea Köthe

## 9 Danksagung

Mein Dank geht zunächst an Herrn Prof. Dr. Handgretinger dafür, dass er sich bereit erklärt hat, meine Dissertation zu betreuen.

Frau Dr. Dr. Maya André danke ich ganz herzlich für das interessante Promotionsthema, die sehr gute Betreuung, stets hilfreiche Kritik, zuverlässige Erreichbarkeit und unermüdliche Geduld. Sie verdient meine besondere Bewunderung dafür, wie sie neben Familie und Arztberuf so viel Zeit für ihre Forschungsgruppe findet.

In der Laborzeit hatte ich das große Glück, sehr freundlich von ihrem Team aufgenommen zu werden. Mein spezieller Dank gilt Aylene Kübler für die großartige Einarbeitung und Unterstützung. Darüber hinaus möchte ich mich bei Dr. Jeanette Woiterski und Barbara Goecke bedanken, die mit ihrer Arbeit einen wichtigen Beitrag für meine Experimente leisteten.

Die Versuche wären nicht möglich gewesen ohne bereitwillige NK Zell-Spender. Dafür bin ich ihnen sehr dankbar.

Und last but not least einen herzlichen Dank meiner lieben Familie und meinen fantastischen Freunden. Sie alle waren immer für mich da, haben mich aufgemuntert und mit mir viele gemeinsame Lernstunden durchgehalten.