

Untersuchungen zur Konversion von Tumor-induzierten Memory-like NK-Zellen

Dissertation

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

vorgelegt von
Marina Isabelle Pal
aus Stuttgart

Tübingen
2016

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

Tag der mündlichen Qualifikation:	19.09.2016
Dekan:	Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel
1. Berichterstatter:	PD Dr. Dr. Maya André
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dominik Hartl

1.	ZUSAMMENFASSUNG	1
2.	SUMMARY	2
3.	EINLEITUNG	3
3.1	AKUTE KINDLICHE LEUKÄMIEN	3
3.1.1	<i>Die akute lymphatische Leukämie</i>	3
3.1.2	<i>Immunphänotypisierung der B-Linien-ALL</i>	3
3.1.3	<i>Ursachen und Prognose</i>	4
3.2	NATÜRLICHE KILLERZELLEN	5
3.2.1	<i>Effektorfunktionen der NK-Zellen</i>	5
3.2.2	<i>NK-Zellrezeptoren</i>	7
3.2.2.1	Aktivierende Rezeptoren	8
3.2.2.2	Inhibitorische Rezeptoren	9
3.2.3	<i>NK-Zellregulation</i>	10
3.2.4	<i>NK-Zellen und Selbsttoleranz</i>	11
3.2.5	<i>NK-Zellentwicklung</i>	11
3.3	NK-ZELLEN UND DAS IMMUNOLOGISCHE GEDÄCHTNIS	12
3.3.1	<i>NK-Zellantworten auf chemische Reizstoffe, Viren und Zytokine</i>	13
3.3.1.1	Hapten- und virusspezifische Memory-NK-Zellen in der Leber	14
3.3.1.2	MCMV-spezifische Memory-NK-Zellen	15
3.3.1.3	Zytokin-induzierte Memory-like NK-Zellen	16
3.3.2	<i>Memory-NK-Zellen im Menschen</i>	16
3.3.2.1	HCMV-spezifische Memory-NK-Zellen	16
3.3.2.2	Humane Zytokin-induzierte Memory-like NK-Zellen	17
3.4	NK-ZELLEN UND IHRE KLINISCHE BEDEUTUNG IN DER THERAPIE VON AKUTEN LEUKÄMIEN	17
3.4.1	<i>NK-Zell-Alloreaktivität und die allogene Zelltherapie</i>	18
3.4.1.1	Die allogene Stammzelltransplantation	18
3.4.1.2	Der adoptive NK-Zelltransfer	19
4.	ZIELE DER ARBEIT	20
5.	MATERIAL UND METHODEN	21
5.1	ALLGEMEINE CHEMIKALIEN	21
5.2	ZELLKULTUR	21
5.2.1	<i>Zelllinien und primäre Leukämien</i>	21
5.2.2	<i>Reagenzien und Equipment</i>	22
5.2.3	<i>Medien und Puffer</i>	23
5.2.4	<i>Standard Zellkulturmethoden</i>	23
5.2.4.1	Zellzahlbestimmung	23
5.2.4.2	Auftauen von Zellen	24
5.2.4.3	Einfrieren von Zellen	24
5.2.4.4	Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)	24
5.2.4.5	Isolation primärer NK-Zellen	24
5.2.4.6	Depletion von T-Zellen	25
5.2.4.7	Mykoplasmentest	25
5.2.5	<i>NKAES</i>	25
5.2.6	<i>Generierung von „Memory-like“ NK-Zellen</i>	25
5.3	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN UND KO-KULTUR EXPERIMENTE	26
5.3.1	<i>Reagenzien und Equipment</i>	26
5.3.2	<i>Puffer</i>	27
5.3.3	<i>Antikörper</i>	27

5.3.4	<i>Versuchsdurchführung</i>	30
5.3.4.1	Färbung von Oberflächenantigenen mit direktmarkierten Primärantikörpern	30
5.3.4.2	Färbung von Oberflächenantigenen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern	30
5.3.4.3	Zellfärbungen mit ARD Lebend-/Tot-Farbstoffen	30
5.3.4.4	<i>In vitro</i> Zytotoxizitätsassay	31
5.3.4.5	Zellzyklusanalyse	31
5.3.4.6	Viabilitätsassay	32
5.3.4.7	Bestimmung der funktionellen NK-Zellantwort	32
5.4	IN VIVO METHODEN	33
5.4.1	<i>NSG-Mäuse</i>	33
5.4.2	<i>Reagenzien und Equipment</i>	33
5.4.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	33
5.4.3.1	Induktion von patienten-spezifischen Leukämien in NSG-Mäusen	33
5.4.3.2	Zellpräparationen	34
5.4.3.3	Adoptiver NK-Zelltransfer	34
5.4.3.4	Retransplantation	34
5.5	IMMUNZYTOCHEMIE	35
5.5.1	<i>Reagenzien und Equipment</i>	35
5.5.2	<i>Antikörper und Farbstoffkonjugate</i>	35
5.5.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	35
5.5.3.1	Konjugatbildung	35
5.5.3.2	Konfokalmikroskopie	36
5.5.3.3	Quantitative Analyse	36
5.6	TRANSKRIPTOM	36
5.6.1	<i>Reagenzien und Equipment</i>	36
5.6.2	<i>Analyse</i>	37
5.7	Q-RT-PCR	37
5.7.1	<i>Reagenzien und Equipment</i>	37
5.7.2	<i>Primer</i>	38
5.7.3	<i>Versuchsdurchführung</i>	38
5.8	SOFTWARE	39
5.9	STATISTIK	39
6.	ERGEBNISSE	40
6.1	EIN TUMOR-PRIMING FÜHRT ZU EINER GESTEIGERTEN UND LANGANHALTENDEN ZYTOTOXIZITÄT IN VITRO	40
6.2	TIML-NK-ZELLEN REAGIEREN TUMOR-SPEZIFISCH	43
6.3	EIN PRIMING MIT ALLOGENEN PBMCs FÜHRT ZU KEINER ERHÖHTEN ZYTOTOXIZITÄT	44
6.4	TIML-NK-ZELLEN ZEIGEN EINE ANTI-LEUKÄMISCHE AKTIVITÄT GEGENÜBER BCP-ALL-BLASTEN IN VIVO	45
6.5	TIML-NK-ZELLEN WEISEN EINEN REIFEN PHÄNOTYPEN AUF	47
6.6	DIE DIFFERENTIELLE GENEXPRESSION DER TIML-NK-ZELLEN	48
6.7	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATION UND VITALITÄT DER TIML-NK-ZELLEN	52
6.8	DIE FUNKTIONELLE NK-ZELLANTWORT DER TIML-NK-ZELLEN NACH TUMOR-RESTIMULATION	54
6.9	DIE IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE DER TIML-NK-ZELLEN	57
7.	DISKUSSION	60
7.1	NK-ZELLEN – TEIL DES ANGEBORENEN ODER ADAPTIVEN IMMUNSYSTEMS?	60
7.2	DIE ZYTOTOXISCHE AKTIVITÄT DER TIML-NK-ZELLEN	61
7.3	TIML-NK-ZELLEN ZEIGEN KEINEN SPEZIFISCHEN PHÄNOTYPEN	63
7.4	DAS GENEXPRESSIONSPROFIL DER TIML-NK-ZELLEN UNTERSCHIEDET SICH VON DEM RUHENDER NK-ZELLEN	64
7.5	EIN TUMOR-PRIMING FÖRdert DIE PROLIFERATION UND VITALITÄT DER TIML-NK-ZELLEN	66
7.6	DIE ERHÖHTE ZYTOTOXIZITÄT WIRD ÜBER EINE VERSTÄRKTE PERFORIN-SEKRETION VERMITTELT	68

7.7	DIE VERÄNDERTE SYNAPSEN-BILDUNG DER TIM1-NK-ZELLEN	70
7.8	UNTERSCHIEDE UND GEMEINSAMKEITEN DER HUMANEN MEMORY-NK-ZELLEN	73
7.9	MECHANISMEN ZUR KONVERSION VON MEMORY-NK-ZELLEN	75
7.10	AUSBLICK	77
8.	LITERATURVERZEICHNIS.....	78
9.	ANHANG	99
10.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	101
10.1	ABKÜRZUNGEN	101
10.2	SI-EINHEITEN, SI-PRÄFIXE UND ZUM GEBRAUCH MIT DEM SI ZUGELASSENE EINHEITEN	105
10.3	ANGLIZISMEN	106
11.	ERKLÄRUNG.....	107
12.	DANKSAGUNG	108

1. ZUSAMMENFASSUNG

Natürliche Killer- (NK-) Zellen sind granuläre Lymphozyten, welche von lymphatischen Vorläuferzellen im Knochenmark abstammen und eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr von virusinfizierten oder tumorösen Zellen spielen. NK-Zellen werden als Komponenten des angeborenen Immunsystems betrachtet, da sie keine antigenspezifischen Oberflächenrezeptoren besitzen, welche durch eine Rearrangierung somatischer Antigenrezeptoren generiert werden. Jedoch konnte unlängst belegt werden, dass NK-Zellen fähig sind, auch adaptive Immunantworten zu vermitteln. Die bislang vorliegenden Erkenntnisse zum immunologischen Gedächtnis der NK-Zellen zeigten, dass Memory-NK-Zellen nach dem Kontakt mit chemischen Reizstoffen oder virusähnlichen Partikeln entstehen oder antigenspezifische Memory-NK-Zellen nach einer Infektion mit bestimmten Viren induziert werden. Des Weiteren können sich Memory-NK-Zellen auch durch alleinige Stimulation mit den Zytokinen IL-12, IL-15 sowie IL-18 entwickeln.

NK-Zellen werden aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen in der Therapie von akuten kindlichen Leukämien eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die adaptiven Eigenschaften von NK-Zellen untersucht werden, um die bisher moderaten Graft versus Leukemia- (GvL-) Effekte der NK-Zellen in der Therapie von akuten kindlichen lymphatischen B-Zell Vorläufer-Leukämien (BCP-ALL) steigern zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass ein Tumor-Priming mit BCP-ALL-Tumorzellen zu einer gesteigerten Funktionalität der sog. Tumor-induzierten Memory-like (TIML-) NK-Zellen führt. Zusammenfassend weisen die in dieser Arbeit erzielten Daten auf eine neue, bisher unbeschriebene adaptive Eigenschaft der NK-Zellen in Form eines immunologischen Gedächtnisses nach einem Tumor-Kontakt hin. Die Integration eines solchen Tumor-Priming-Schrittes und die Verwendung von TIML-NK-Zellen in adoptiven NK-Zelltransferprotokollen zur Therapie von akuten kindlichen lymphatischen B-Zell Vorläufer-Leukämien, könnte eine neue, vielversprechende und individualisiert auf den Patienten zugeschnittene Behandlungsstrategie darstellen.

2. SUMMARY

Natural killer (NK) cells are granular lymphocytes descending from common lymphoid progenitor cells in the bone marrow and play a key role in immune defense against virus-infected or tumorous cells. NK cells are classified as innate immune cells and lack the competency to undergo somatic rearrangements of their receptors. However, it has been reported that NK cells are capable of mediating adaptive immune responses. Recent NK cell research is providing evidence for the induction of: liver-restricted NK memory cells after contact with chemical irritants or virus-like particles, antigen-specificity NK memory cells following virus infections and NK memory cells upon exposure to the cytokines IL-12, IL-15 and IL-18 alone.

Due to the fact that NK cells display a cytotoxic activity against transformed tumor cells, they were used for treatment of acute pediatric leukemia. In the presented work the analyses should examine whether tumor-priming could promote the generation of memory NK cells with enhanced graft-versus-leukemia (GvL) reactivity to improve the clinical efficacy of adoptive NK cell transfer in relapsing pediatric BCP-ALL patients. Substantial findings in this work demonstrate that priming of naive human NK cells with pediatric acute B cell leukemia specimens induced increased functional effector responses of tumor-induced memory-like (TIML) NK cells. In summary, the formation of TIML-NK cells strongly indicates a so far unacknowledged mode of immunologic NK cell memory after tumor-priming. The generation of TIML-NK cells and the integration of a tumor-priming step could present a promising new and individualized treatment strategy of future adoptive NK cell transfer protocols to augment the overall modest GvL effects of NK cells towards pediatric BCP-ALL.

3. EINLEITUNG

3.1 Akute kindliche Leukämien

Akute Leukämien sind bösartige Erkrankungen des blutbildenden Systems und stellen mit 31 % die häufigsten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter dar (Annesley und Brown, 2015; Hunger und Mullighan, 2015). Bei der akuten Leukämie findet eine maligne Veränderung (Transformation) in unreifen hämatopoetischen Vorläuferzellen statt. Diese unreifen transformierten Zellen, oder auch leukämische Blasten, proliferieren unkontrolliert und verdrängen die gesunde Hämatopoese im Knochenmark. Die Folgen sind Blutarmut, erhöhte Blutungsneigung, Immunschwäche und Infektionen aufgrund der Reduktion ausgereifter und funktioneller Blutzellen. Die Blasten akkumulieren jedoch nicht nur im Knochenmark, sondern auch im peripheren Blut, in den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, Thymus) oder in ganzen Organsystemen wie z.B. im Zentralnervensystem. Die akute Leukämie wird daher auch als bösartige Systemerkrankung bezeichnet. Je nach Herkunft der entarteten Zelle werden akute Leukämien in myeloische (AML) oder lymphatische Leukämien (ALL) unterschieden.

3.1.1 Die akute lymphatische Leukämie

Die ALL ist mit einem Anteil von etwa 80 % die häufigste Form der Leukämie im Kindes- und Jugendalter (Howlader *et al.* 2015). Bei der ALL findet eine maligne Entartung in einer unreifen Vorläuferzelle der Lymphozyten statt. Da diese Entartung in verschiedenen Stufen der Zellentwicklung stattfinden und verschiedene Lymphozyten-Untergruppen bzw. deren Vorstufen betreffen kann, wird die ALL gemäß der WHO-Klassifikation von 2008 in drei Hauptgruppen unterteilt: die nicht eindeutige akute lymphatische Leukämie, die B-ALL und die T-ALL (Vardiman *et al.*, 2009). B-ALL-Formen gehen aus Vorläuferzellen der B-Lymphozyten hervor, T-ALL-Formen aus Vorstufen der T-Lymphozyten. Anders als im Erwachsenenalter, lassen sich etwa 85 % der ALL im Kindes- und Jugendalter der B-lymphozytären Reihe und etwa 15 % der T-lymphozytären Reihe zuordnen (Schrappe *et al.*, 2000; Chiaretti und Foa, 2009; Moricke *et al.*, 2010).

3.1.2 Immunphänotypisierung der B-Linien-ALL

Die B-ALL wird weiter in die B-Zell Vorläufer-ALL (BCP-ALL) und die reif(zellig)e B-ALL unterteilt, wobei die B-ALL-Zellen dabei nach ihrem Reifungsgrad eingeteilt werden. Die pro-B-ALL ist die unreifste Form, gefolgt von der common ALL und der prä-B-ALL. Dagegen zeigt die reife B-ALL bereits viele Merkmale reifer B-Lymphozyten (Bene *et al.*, 1995; McGregor *et al.*, 2012). Die BCP-ALL Unterformen sind mit ca. 82 % die häufigsten Formen akuter lymphatischer Leukämie im

Kindes- und Jugendalter (Pui *et al.*, 2008). Die Immunphänotypisierung der verschiedenen B-ALL Unterformen anhand der CD-Marker ist Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Übersicht der B-ALL Unterformen

B-ALL Unterformen / Antigene	Pro-B	Common	Prä-B	Reife
CD10	-	+	+/-	+/-
CD19	+	+	+	+
CD22	+	+	+	+
CD79a	+	+	+	+
TdT	+	+	+	-
Ig	-	-	-	+

3.1.3 Ursachen und Prognose

Eine B-ALL stellt eine Gesamtheit verschiedener somatischer Genveränderungen dar (Hunger und Mullighan, 2015). Diese genetischen Veränderungen können Punktmutationen der DNA, eine Änderung der Chromosomenanzahl (Aneuploidien) sowie die Mutation der Chromosomen selbst beinhalten. Hierzu gehören Translokationen, Deletionen und Insertionen (Harrison, 2009). Viele dieser Veränderungen stören essentielle zelluläre Prozesse, wie z.B. die transkriptionelle Regulation der lymphatischen Entwicklung, den Zellzyklus oder Tumorsuppressorsignalwege (Ma *et al.*, 2015). Hyperploidien (> 50 Chromosomen) treten bei 25-30 % aller Kinder mit B-ALL auf und sind prognostisch günstig, während Hypoploidien (< 44 Chromosomen) bei 2-3 % auftreten und eher mit einer schlechten Prognose verbunden sind (Nachman *et al.*, 2007). Wichtige Beispiele für chromosomale Translokationen oder Rearrangements sind die *ETV6-RUNX1* Fusion (prognostisch günstig) und die t(9;22) (q34;q11.2) Translokation, welche zur Formation des Philadelphia-Chromosoms führt und für das Fusionsprotein BCR-ABL, eine aktivierte Tyrosinkinase, kodiert (prognostisch ungünstig). Es sind zudem mehr als 70 verschiedene Rearrangements bekannt, welche das Chromosom 11q23 und das *MLL*-Gen betreffen (prognostisch ungünstig) und bei Kindern unter einem Jahr in 75 % der Fälle auftreten (Meyer *et al.*, 2013). Mit Ausnahme der *MLL*-rearrangierten Leukämien bei Kindern, weist jede B-ALL typischerweise mehrere verschiedene genetische Veränderungen auf. Klinisch spielen neben den letztgenannten Risikofaktoren das Alter des Patienten sowie die initiale Leukozytenanzahl eine wichtige Rolle (Smith *et al.*, 1996). Die Identifizierung der Risikofaktoren ist von großer Bedeutung, da Hochrisiko-Patienten gefährdet sind, ein Rezidiv zu

erleiden und daher eine intensivere Behandlung erhalten (Pui *et al.*, 2008). Die Behandlung eines Kindes mit einer BCP-ALL erfolgt in vier aufeinanderfolgenden Therapieabschnitten, in deren Zentrum zellwachstumshemmende Zytostatika stehen: der Induktions-, der Konsolidierungs-, der Reinduktions- und der Erhaltungstherapie. Diese Therapiephasen sind von unterschiedlicher Dauer, sowie Intensität und unterscheiden sich hinsichtlich der eingesetzten Medikamentenkombinationen (Moricke *et al.*, 2010). Eine Hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) wird bei Kindern durchgeführt, die besonders schwerwiegende und seltene Risikofaktoren aufweisen, oder bei denen die B-ALL nach einer Remission rezidiert. Letztlich hat sich die Prognose für Kinder mit einer B-ALL in den letzten Jahrzehnten jedoch wesentlich verbessert, indem die ereignisfreie Überlebensrate von 5 Jahren auf ca. 80 % stieg (Moricke *et al.*, 2010; Pui und Evans, 2013; Freireich *et al.*, 2014).

3.2 Natürliche Killerzellen

Das Immunsystem wird klassischerweise in die adaptive und die angeborene Immunität unterteilt. Die verschiedenen Eigenschaften der angeborenen Immunität gehen auf eine breitgefächerte Vielfalt an myeloiden und lymphoiden Zellen zurück, welche durch ihr limitiertes Repertoire an Keimbahnkodierten Rezeptoren schnelle Effektorfunktionen ausüben können. Im Gegensatz hierzu wird die adaptive oder „erworbene“ Immunität von zwei Lymphozytentypen charakterisiert: Den B- und T-Zellen, welche ein großes Repertoire an Antigenrezeptoren exprimieren, die durch ortsspezifische, somatische Rekombination entstehen: Die T-Zell-(TZR) und B-Zellrezeptoren (BZR). Naive T- und B-Zellen treffen in spezialisierten lymphoiden Organen auf fremde Antigene und werden dort einem Zellteilungs- und Reifungsprozess unterzogen bevor sie ihre Effektorfunktionen ausüben. Natürliche Killer-(NK-)Zellen repräsentieren eine Untergruppe der Leukozyten. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 1975 werden NK-Zellen aufgrund ihrer Morphologie, der Expression von vielen lymphoiden Markern und ihres Ursprungs aus lymphatischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, als Lymphozyten klassifiziert (Herberman *et al.*, 1975; Kiessling *et al.*, 1975; Colucci *et al.*, 2003). Weil ihnen jedoch antigenspezifische Oberflächenrezeptoren fehlen, werden NK-Zellen als Komponenten der angeborenen Immunantwort betrachtet. Im Menschen sowie in Mäusen konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen an der frühen Bekämpfung von Virusinfektionen, wie z.B. dem Herpesvirus und an der Immunüberwachung von Tumoren beteiligt sind (Smyth *et al.*, 2002; S. H. Lee *et al.*, 2007).

3.2.1 Effektorfunktionen der NK-Zellen

NK-Zellen werden neben den $\gamma\delta$ -T-Zellen und den NKT-Zellen auch als angeborene lymphoide Zellen (ILCs) bezeichnet (Girardi *et al.*, 2001; Crowe *et al.*, 2002; Marcus *et al.*, 2014). NK-Zellen sind entgegen den adaptiven $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen in der Lage, ohne eine spezifisch vorangegangene Immunisierung, den direkten Tod einer virusinfizierten oder Tumor-Zelle einzuleiten. Wie auch bei den $CD8^+$ T-Zellen, basiert die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen auf einer

gerichteten Exozytose von Granula, welche lytische Proteine wie Perforin, Granzyme und möglicherweise auch Fas-Liganden (FasL) enthalten (Trapani und Smyth, 2002; Bossi und Griffiths, 2005). Die Lyse einer Tumorzelle setzt eine Adhäsion der Targetzelle und die Ausbildung einer immunologischen Synapse (IS) zwischen NK- und Tumorzelle (Konjugatbildung) voraus. Genauer wird der Prozess der Konjugatbildung in die Erkennungs-, Effektor- und in die Terminationsphase unterteilt (Mace *et al.*, 2014). Ein Merkmal für die Erkennungsphase ist die Konvergenz der lytischen Granula, welche bedeutet, dass die lytischen Granula nach Target-Kontakt am Mikrotubuliorganisierenden Zentrum (MTOC) der NK-Zelle zusammenlaufen und dort aufeinandertreffen. Für die Effektorphase sind die Aktinpolymerisation und die Polarisation des MTOC der NK-Zelle kennzeichnend, welche die Näherung des MTOC an die immunologische Synapse sowie die Fusion der lytischen Granula beschreibt (Mace *et al.*, 2014).

Perforin und Granzyme werden von NK-Zellen im Unterschied zu CD8⁺ T-Zellen konstitutiv exprimiert und gespeichert (Trapani, 2001). Die in der immunologischen Synapse exozytierten Perforinmonomere polymerisieren in Anwesenheit von Ca²⁺ und verursachen als Polyperforine Löcher in den Zellmembranen der Tumorzellen. Dadurch wird deren Zellintegrität zerstört und es können Granzyme eindringen, welche die Apoptose in den Targetzellen induzieren (Krahenbuhl und Tschopp, 1991; Shi *et al.*, 1992; Andrin *et al.*, 1998). Die Degranulation der NK-Zellen, welche die Exozytose der lytischen Granula beschreibt, kann über CD107a, dem lysosomalen Membranglykoprotein-1 (LAMP-1), nachgewiesen werden. CD107a ist zusammen mit Perforin in den sekretorischen Lysosomen kolokalisiert. LAMP-1 wird bei der Fusion der Granula mit der Zellmembran an die Zelloberfläche transportiert und danach wieder internalisiert. Über eine CD107a-Oberflächenfärbung wird so die Degranulation der zytotoxischen NK-Zellen nach einer Stimulation mit den Tumorzellen bestimmt (Bryceson *et al.*, 2005). Die Apoptose in Tumorzellen, welche zuvor Kontakt mit zytotoxischen NK-Zellen hatten, kann zudem über Rezeptor-vermittelte Signalwege (über die sog. Todesrezeptoren) wie TRAIL und FasL ausgelöst werden (Nagata, 1997; Johnsen *et al.*, 1999; Smyth *et al.*, 2003). Hier wird z.B. durch die Bindung des Fas-Liganden (CD95L) an CD95⁺ Tumorzellen eine endogene Proteolysekaskade in Gang gesetzt und so die Apoptose in den Zielzellen eingeleitet (Vujanovic *et al.*, 1996). Aktivierte NK-Zellen sind darüber hinaus potente Produzenten von diversen Zytokinen, wie IFN- γ , dem proinflammatorischen TNF, Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF, sowie verschiedenen Chemokinen (Vivier *et al.*, 2011). Während die biologische Funktion der Wachstumsfaktoren nicht eindeutig ist, spielt z.B. die Sekretion von Chemokinen eine Schlüsselrolle in der Kolokalisation von NK-Zellen und dendritischen Zellen (A. Moretta *et al.*, 2005). NK-Zellen sind außerdem in der Lage, die Aktivität anderer Leukozyten, wie z.B. T-Zellen über die sekretierten Zytokine oder verschiedene Rezeptor-Liganden-Interaktionen zu modulieren (Martin-Fonoteca *et al.*, 2004).

So beeinflusst die NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen die T-Zellantwort möglicherweise nicht nur durch die Reduktion der Antigenlast, sondern auch durch die geförderte Prä-Sensibilisierung der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch Targetzelldebris (Robbins *et al.*, 2007; Krebs *et al.*, 2009). Besonders das von NK-Zellen produzierte Zytokin IFN- γ besitzt eine starke antitumorale Wirkung und wird positiv mit der Überlebensrate von Patienten mit verschiedenen Krebsarten assoziiert (Menard *et al.*, 2009). Das ebenfalls von NK-Zellen sekretierte Zytokin TNF besitzt eine direkte zytotoxische Aktivität, indem es die Caspase-8-vermittelte Apoptose auslöst (Peter und Krammer, 2003). Daneben führt die Kombination aus TNF und IFN- γ Tumorzellen in die Seneszenz (Braumuller *et al.*, 2013).

3.2.2 NK-Zellrezeptoren

NK-Zellen sind mit einer Reihe von Rezeptoren ausgestattet, welche die NK-Zellaktivität entweder stimulieren (aktivierende Rezeptoren) oder abschwächen (inhibitorische Rezeptoren) (Vivier *et al.*, 2004; Bryceson *et al.*, 2006). Eine Übersicht der NK-Zellrezeptoren findet sich in Abb. 1. Aktivierende Rezeptoren beinhalten Rezeptoren, welche mit löslichen Liganden wie Zytokinen oder Antigenen auf Zelloberflächen interagieren. Zytokinrezeptoren, welche an die common- γ -chain (γ c) gekoppelt sind, wie IL-15R, IL-2R und IL-21R, sind sowohl an der NK-Zellentwicklung als auch an deren Effektorfunktionen beteiligt. Insbesondere IL-15 ist für die Reifung und das Überleben der NK-Zellen essentiell (Caligiuri, 2008).

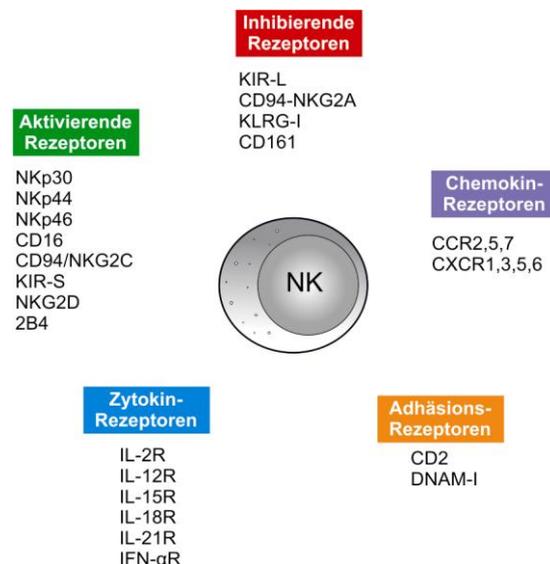


Abbildung 1: Die humanen NK-Zellrezeptoren. NK-Zellen exprimieren eine Reihe von Oberflächenrezeptoren, die in aktivierende Rezeptoren (grün), inhibierende Rezeptoren (rot), Zytokin-Rezeptoren (blau), Chemokin-Rezeptoren (lila) und Adhäsions-Rezeptoren (orange) unterteilt werden können. Hier ist eine Auswahl einiger wichtiger Rezeptoren dargestellt. Neben den MHC-Klasse-I-spezifischen KIR- und CD94/NKG2A-Rezeptoren regulieren auch andere inhibitorische Rezeptoren die NK-Zellreaktivität, welche spezifisch für nicht-MHC-Liganden sind. Eigene Darstellung nach Vivier *et al.*, 2011.

3.2.2.1 Aktivierende Rezeptoren

NK-Zellen führen ihre biologischen Funktionen auf vielfältige Weise aus. Sie sind in der Lage, IgG-tragende Zellen über ihren Fc γ RIIIA (CD16) Rezeptor zu detektieren, hierüber eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) auszuüben und Zytokine zu produzieren. CD16 ist an die Signaltransduktionspolypeptide CD3 ζ und FcR γ gekoppelt, welche aktivierende Tyrosin-haltige Immunrezeptor Motive (ITAM) enthalten (Perussia, 1998). Die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCRs; NKp46, NKp44 und NKp30) gehören ebenfalls zu den aktivierenden Rezeptoren, welche an die ITAM-enhaltenden Adaptermoleküle CD3 ζ , FcR γ oder DAP12 binden (A. Moretta *et al.*, 2001). Das Signal wird nachfolgend an Syk- und ZAP70- Kinasen weitergeleitet, was zu einer Aktivierung der PI3-Kinase, der Phospholipase-C und der VAV-Proteine führt (Spaggiari *et al.*, 2001; Upshaw *et al.*, 2005). Der durch diese Signaltransduktion verursachte Calcium-Fluss steuert unter anderem die Reorganisation des Zytoskeletts, die zelluläre Zytotoxizität und die Zytokinproduktion (Pessino *et al.*, 1998; Cantoni *et al.*, 1999; Pende *et al.*, 1999). *In vitro* Studien belegen für alle drei dieser natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren eine Beteiligung in der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Pende *et al.*, 1999; A. Moretta *et al.*, 2001; Arnon *et al.*, 2004). Im Menschen werden NKp30 und NKp46 auf allen NK-Zellen, NKp44 nur auf aktivierten NK-Zellen exprimiert. Obwohl die Liganden weitestgehend unbekannt sind, können NKp46 und NKp44 im Falle des Influenza- oder Parainfluenza-Virus mit Hämagglutininen, NKp30 und NKp46 mit Heparansulfat-Proteoglykanen und NKp30 mit dem HLA-B assoziierten Transkript 3 und B7-H6 interagieren (Mandelboim *et al.*, 2001; Bloushtain *et al.*, 2004; Pogge von Strandmann *et al.*, 2007; Kaifu *et al.*, 2011).

Ein Merkmal von einigen aktivierenden NK-Zellrezeptoren besteht darin, „eigene“ Moleküle zu erkennen, welche durch zellulären Stress induziert werden (Bottino *et al.*, 2005). Dies trifft für den Rezeptor NKG2D zu, welcher mit verschiedenen Liganden wechselwirkt, die in den meisten Geweben in kleinen Konzentrationen exprimiert, aber im Falle einer zellulären Stresssituation überexprimiert werden (Raulet und Guerra, 2009). NKG2D ist ein C-Typ Lektin-Transmembran-Homodimer, welcher an das Adaptorprotein DAP10 bindet und dieses nachfolgend die p85-Untereinheit der PI3K und GRB2 rekrutiert (Wu *et al.*, 1999; Diefenbach *et al.*, 2002). Diese Signalmoleküle stimulieren die Zytotoxizität, die Zytokinproduktion und die Proliferation. Die Liganden von NKG2D sind MICA, MICB und die UL16-Bindeproteine (Sutherland *et al.*, 2002). Diese werden auf vielen humanen Tumoren und Leukämien exprimiert (Salih *et al.*, 2003). Die Expression von NKG2D auf NK-Zellen stellt daher einen wichtigen Faktor für die Eliminierung von Tumorzellen dar (Diefenbach und Raulet, 2001). Ein weiteres Mitglied der C-Typ Lektin-Rezeptoren ist der Heterodimer CD94/NKG2C. CD94/NKG2C stellt einen aktivierenden Rezeptorkomplex dar, an welchen die nicht-klassischen MHC-Klasse-Ib HLA-E Moleküle binden und der mit dem ITAM-enhaltenden DAP12 assoziiert.

Nach der erfolgreichen Rezeptor-Liganden-Bindung, werden die Tyrosinreste des ITAM-Motivs von DAP12 durch Tyrosinkinase der Src-Familie phosphoryliert, was in einer Rekrutierung von Syk- und ZAP70-Signalmolekülen resultiert. Eine nachfolgende Signalkaskade aktiviert z.B. den zu den Mitogen-aktivierten- (MAP-) Kinasen gehörenden ERK-Signalweg (McVicar *et al.*, 1998). Zur Familie der SLAM-verwandten Rezeptoren, einer Untergruppe der CD2-Familie, gehören die aktivierenden Rezeptoren 2B4 (CD244) und DNAM-1 (CD226). Die Signalweiterleitung von 2B4 unterscheidet sich grundlegend von dem anderer aktivierender Rezeptoren. 2B4 rekrutiert das SLAM-assoziierte Protein SAP mittels Immun-Tyrosin-basierter Schaltermotive (ITSM) und leitet das Signal so an den PI3K-Signalweg weiter (Chen *et al.*, 2004; Eissmann *et al.*, 2005). Der Ligand von 2B4 ist CD48, der auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und durch dessen Bindung die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen induziert (Brown *et al.*, 1998; Stark und Watzl, 2006). DNAM-1 interagiert mit dem Adhäsionsmolekül LFA-1 auf der Zelloberfläche und potenziert hierdurch aktivierende Signale (Shibuya *et al.*, 1999). Es wurden zwei Liganden von DNAM-1 identifiziert: Der Poliovirus-Rezeptor PVR (CD155) und Nectin-2 (CD112), welche meist auf Tumorzellen exprimiert werden und zusammen mit anderen aktivierenden Rezeptoren wie 2B4 und NKp46, essentiell für das Einleiten der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität und der Zytokinproduktion sind (Bottino *et al.*, 2003; Bryceson *et al.*, 2006).

3.2.2.2 Inhibitorische Rezeptoren

NK-Zellen exprimieren eine Reihe von Rezeptoren, die durch die Bindung von MHC-Klasse-I-Molekülen inhibitorische Signale vermitteln. Hierzu gehören die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR), welche direkt MHC-Klasse-Ia-Moleküle erkennen können sowie der heterodimere Rezeptorkomplex CD94/NKG2A, welcher das nicht-klassische MHC-Klasse-Ib HLA-E bindet (Braud *et al.*, 1998; N. Lee *et al.*, 1998; Vance *et al.*, 1998). Bisher sind 15 *KIR*-Gene und zwei Pseudogene bekannt, welche von einer im *KIR*-Locus auf Chromosom 19 befindlichen 150 kb-großen Region kodiert werden. Von diesen *KIR*-Genen kodieren 11 Gene für Rezeptoren mit zwei Immunglobulin-domänen (*KIR2D*-Gene) und vier für Rezeptoren mit drei Domänen (*KIR3D*-Gene) (Marsh *et al.*, 2003). Die Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren lassen sich weiter aufgrund ihrer Funktion in inhibierend und aktivierend unterteilen, wobei hier nur auf deren inhibierende Funktion eingegangen wird. Die inhibierenden KIR-Rezeptoren umfassen die Isoformen KIR2DL und KIR3DL mit je zwei oder drei Immunglobulin-domänen (D) und langer zytoplasmatischer Domäne (L) (Andre *et al.*, 2001). Liganden von KIR2DL2 und KIR2DL3 sind die HLA-C-Allelprodukte der Gruppe 1, von KIR2DL1 HLA-C-Moleküle der Gruppe 2 (L. Moretta *et al.*, 1992; Colonna *et al.*, 1993; Wagtmann *et al.*, 1995). KIR3DL1 bindet HLA-B-Allotypen mit dem serologischen Bw4-Motiv, KIR3DL2 HLA-A3 und HLA-A11 (Cella *et al.*, 1994; Gumperz *et al.*, 1995; Pende *et al.*, 1996).

Allgemein leiten die inhibitorischen Rezeptoren ihre Signale über ITIM-Motive an ihren cytoplasmatischen Enden weiter, welche bei einer Aktivierung phosphoryliert werden und darauffolgend die Tyrosinphosphatasen SHP-1 und SHP-2 rekrutieren (Lanier, 1998; Long, 1999). Diese Phosphatasen inhibieren ihrerseits die Aktivierung durch die Dephosphorylierung von einem oder mehreren kritischen Signalmolekülen wie z.B. VAV-1 (Binstadt *et al.*, 1996; Burshtyn *et al.*, 1996; Olcese *et al.*, 1996).

3.2.3 NK-Zellregulation

Jeder inhibitorische KIR- oder CD94/NKG2A-Rezeptor wird nur auf einem Teil aller NK-Zellen exprimiert, so dass das resultierende NK-Zellrepertoire die Erkennung von Zellen erlaubt, welche nur ein einziges MHC-Klasse-Ia-Allel verloren haben (A. Moretta *et al.*, 1996; Raulet *et al.*, 2001; Shilling *et al.*, 2002). Weil ein selektiver Verlust oder eine Veränderung der MHC-Klasse-I-Expression eine verbreitete Eigenschaft von vielen Tumorzellen ist, ermöglicht es die verschiedenartige KIR-Expression den NK-Zellen, Tumor- oder fremdartige Zellen zu erkennen und zu eliminieren (Garrido *et al.*, 1997).

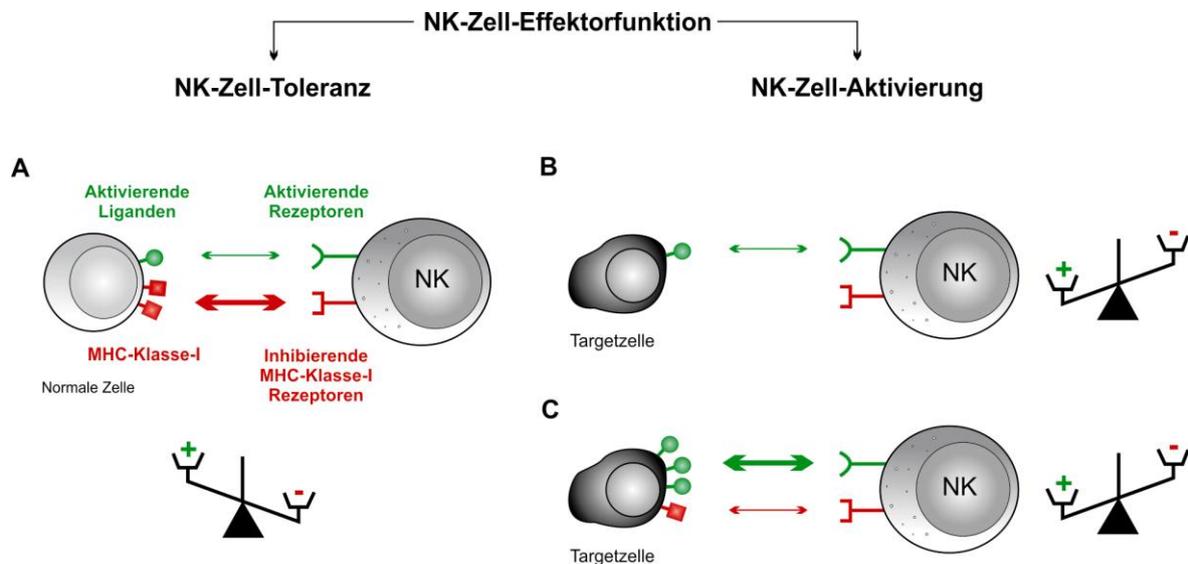


Abbildung 2: Die dynamische Regulation der NK-Zell-Effektorfunktion. NK-Zellen nehmen die Dichte der verschiedenen Oberflächenmoleküle einer interagierenden Zelle wahr. Die Qualität und Intensität der NK-Zellantwort ergibt sich aus der Summe der verschiedenen positiven oder negativen Signale. NK-Zellen verschonen gesunde Zellen, welche MHC-Klasse-I-Moleküle und nur eine geringe Anzahl an stressinduzierten Molekülen exprimieren (**A**), während sie selektiv Zellen abtöten, die MHC-Klasse-I-Moleküle herunterregulieren („missing self“) (**B**) und/oder stressinduzierte Moleküle wie die NKG2D-Liganden hochregulieren (**C**). +, Aktivierende Rezeptoren; -, inhibitorische Rezeptoren. Eigene Darstellung nach Vivier *et al.*, 2011.

Die Erkennung und Zerstörung von Zellen, welchen MHC-Klasse-I-Moleküle fehlen, wird als „Missing-self“-Hypothese bezeichnet (Ljunggren und Karre, 1990). Demnach verschonen NK-Zellen gesunde Zellen, welche MHC-Klasse-I-Moleküle und nur eine geringe Anzahl an stressinduzierten Molekülen exprimieren, während sie selektiv Zellen abtöten, die MHC-Klasse-I-Moleküle herunterregulieren und/oder stressinduzierte Moleküle wie die NKG2D-Liganden überexprimieren (Raulet und Guerra, 2009). In Abb. 2 wird die komplexe Balance zwischen aktivierenden und inhibitorischen Signalen dargestellt.

3.2.4 NK-Zellen und Selbsttoleranz

NK-Zellen besitzen wie B- und T-Zellen das Potential für Autoreaktivität, auch wenn die Gene der NK-Zellrezeptoren keinem somatischen Rearrangement unterliegen. Die Ursache hierfür ist, dass manche NK-Zellen keine inhibitorischen Rezeptoren besitzen, welche die MHC-Klasse-I-Moleküle des Wirts binden (Fernandez *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Eine weitere Ursache ist, dass NK-Zellen aktivierende Rezeptoren exprimieren, welche Selbst-Liganden inklusive der MHC-Moleküle erkennen (A. Moretta *et al.*, 1995; Lanier, 2005; Stewart *et al.*, 2005). Dieses Expressionsmuster ergibt sich daher, weil das Spektrum an Rezeptoren, das NK-Zellen während ihrer Entwicklung exprimieren, weitgehend zufällig ist und die MHC-Liganden, welche durch diese Rezeptoren erkannt werden, unabhängig von den Rezeptorgenen vererbt werden (Parham, 2005). Infolgedessen exprimieren manche NK-Zellen aktivierende Rezeptoren für Selbst-Liganden, aber keine inhibitorischen Rezeptoren für eigene MHC-Moleküle. Um eine Autoreaktivität zu vermeiden, erwerben NK-Zellen in einem als „Education“ bezeichneten Prozess eine sog. „Selbsttoleranz“. Im Menschen konnte gezeigt werden, dass potenziell autoreaktive NK-Zellen einen Zustand der „Hyporeaktivität“ (hyporesponsiveness) erlangen, was einem Zustand verminderter Reaktivität gleicht (Raulet *et al.*, 2001; Fernandez *et al.*, 2005; Anfossi *et al.*, 2006). Nach dieser Hypothese sind NK-Zellen gegenüber verschiedenen Stimuli aktivierender Rezeptoren hyporeaktiv, wenn ihnen als „Gegengewicht“ inhibierende Rezeptoren für MHC-Klasse-I-Moleküle fehlen. NK-Zellen sind so nicht nur areaktiv gegenüber körpereigenen Zellen, sondern zeigen auch eine verminderte Reaktion gegenüber zahlreichen anderen Stimuli, wie z.B. MHC-Klasse-I-defizienten Tumorzellen.

3.2.5 NK-Zellentwicklung

NK-Zellen sind lymphatischen Ursprungs und entwickeln sich aus CD34⁺-Stammzellen im Knochenmark (Colucci *et al.*, 2003). Die Vorläufer der NK-Zellen (prä-NK) sind in der Lage, wie vermutlich auch die NK-Zellen anderer Entwicklungsstadien, in verschiedene Gewebe wie Milz, Leber, Lymphknoten und Thymus einzuwandern, um sich dort einer weiteren Reifung zu unterziehen (Freud und Caligiuri, 2006; Huntington *et al.*, 2007). Freud *et al.* definierten vier aufeinanderfolgende funktionell unterschiedliche Entwicklungsstadien der NK-Zellen (siehe Tabelle 2) (Freud *et al.*, 2006).

Tabelle 2: Stadien der NK-Zellentwicklung

	Entwicklungsstadium	Oberflächenantigene
1	Vorläufer-NK-Zellen (pro-NK)	CD34 ⁺ CD117 ⁻ CD94 ⁻ CD56 ⁻
2	Vorläufer-NK-Zellen (prä-NK)	CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD94 ⁻ CD56 ^{-/(+)}
3	Unreife NK-Zellen (iNK)	CD34 ⁻ CD117 ⁺ CD94 ⁻ CD56 ^{-/(+)}
4	Reife NK Zellen (mNK CD56 ^{bright})	CD34 ⁻ CD117 ^{+/-} CD94 ⁺ CD56 ^{bright} NKp46 ⁺ CD16 ⁻
	Reife NK Zellen (mNK CD56 ^{dim})	CD34 ⁻ CD117 ^{+/-} CD94 ⁺ CD56 ^{dim} NKp46 ⁺ CD16 ⁺

Vorläufer-NK-Zellen des 1. Stadiums exprimieren IL-2R β , was die Reaktivität gegenüber IL-2 und IL-15 induziert, welche ab dem 2. Stadium der Vorläufer-NK-Zellen die Entwicklung lenken. Während IL-2 aufgrund verschiedener Studien als entbehrlich gilt, ist IL-15 dagegen für die Entwicklung, Expansion und die Homöostase der NK-Zellen unabdingbar (DiSanto *et al.*, 1990; Kundig *et al.*, 1993; Kennedy *et al.*, 2000; Ranson *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu den pro- und prä-NK-Zellen, haben die unreifen iNK-Zellen des 3. Stadiums ihre Fähigkeit verloren, sich in T- oder DC-Zellen zu entwickeln. Des Weiteren sind unreife iNK-Zellen nicht in der Lage eine Perforin-abhängige zytotoxische Aktivität zu vermitteln oder IFN- γ zu produzieren. Diese Eigenschaften erlangen sie erst als reife mNK-Zellen zusammen mit der Expression der NK-Zellrezeptoren NKG2D oder NKp46 im 4. Stadium (Freud und Caligiuri, 2006). Die Expression des inhibierenden Rezeptors CD94 auf reifen mNK-Zellen erfolgt in der Entwicklung früher als die der KIR-Rezeptoren. CD56^{dim}NKG2A⁻KIR⁺ Zellen stellen so die reifste Entwicklungsstufe der mNK-Zellen dar, welche sich aus CD56^{dim}NKG2A⁺KIR⁻ Zellen über CD56^{dim}NKG2A⁺KIR⁺ Zellen entwickeln (Miller und McCullar, 2001).

3.3 NK-Zellen und das immunologische Gedächtnis

Das Immunsystem besitzt die Eigenschaft, aus vergangenen Aufeinandertreffen mit Pathogenen zu lernen und bei einer erneuten Infektion schneller und stärker zu reagieren. Dieses Phänomen wird als adaptive Immunität oder immunologisches Gedächtnis bezeichnet. Üblicherweise wird die Fähigkeit zur adaptiven Immunität der Möglichkeit einer Rearrangierung somatischer Antigenrezeptoren zugeschrieben, welche in B- und T-Zellen stattfindet und im Stande ist, eine große Anzahl an Zellen mit verschiedenen klonalen Spezifitäten zu generieren. Der hier zugrunde liegende Schlüsselmechanismus beruht auf den Genen *Rag1* und *Rag2*, welche für die Untereinheiten der RAG-Rekombinase kodieren, aus denen sich die B- und T-Zellrezeptoren zusammensetzen und die Antigenrezeptor-Vielfalt erzeugen.

Nach einem Erstkontakt mit einem Antigen proliferieren naive antigenspezifische T- oder B-Zellen intensiv in einem Prozess, der als klonale Expansion bezeichnet wird, wobei manche Zellen zu Gedächtnis- oder „Memory-“ Zellen differenzieren (Williams und Bevan, 2007). Während die meisten Effektorzellen nach der primären Immunantwort in der sog. „Kontraktionsphase“ absterben, bleiben die antigenspezifischen Memory-Zellen im Vergleich zu den naiven antigenspezifischen Zellen in erhöhter Anzahl erhalten. Nach der Re-Exposition des Antigens üben Memory-Zellen ihre funktionellen Antworten im Vergleich zu naiven Zellen schneller aus. Daher führt die erhöhte Zahl an Memory-Zellen, verbunden mit ihrer schnellen Reaktionsfähigkeit, zu einer enorm verstärkten Antwort in Folge einer zweiten Antigen-Exposition, was als „recall response“ bezeichnet wird.

Das Immunsystem ist zudem in der Lage, eine Reihe von schnellen Reaktionen auszuführen, welche keine Prä-Sensibilisierung benötigen und zur angeborenen Immunität gehören. Die angeborenen Effektorfunktionen beruhen auf Keimbahn-kodierten Rezeptoren, welche keine klonale Expansion benötigen. Das angeborene Immunsystem umfasst viele verschiedene Arten von Zellen, wovon jede Art spezifische Funktionen erfüllen. Zu diesen Zellen gehören phagozytische Zellen wie Makrophagen und Neutrophile, welche für die Eliminierung von Bakterien und Parasiten nötig sind und andere Zelltypen, wie dendritische Zellen, welche als Sensoren für Pathogene dienen und andere Leukozyten alarmieren und aktivieren. Obwohl NK-Zellen, welche dem angeborenen Immunsystem angehören, keine somatischen Rekombinationsmechanismen ihrer Antigenrezeptoren besitzen, wurde unlängst berichtet, dass sie fähig sind adaptive Immunantworten zu vermitteln. Bisher wurde angenommen, dass diese Eigenschaft ein alleiniges Merkmal der B- und T-Zellen ist.

3.3.1 NK-Zellantworten auf chemische Reizstoffe, Viren und Zytokine

NK-Zellen galten bisher lediglich als unspezifische, kurzlebige und schnelle Effektorzellen. Indem ihnen jedoch eine begrenzte Antigenpezifität, eine erhöhte Lebensdauer und verstärkte Effektorantworten nachgewiesen werden konnten, überschreiten NK-Zellen die Grenze zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Obwohl nicht alle klassischen Eigenschaften der adaptiven Immunität auch bei Memory-NK-Zellen belegt werden konnten, zeigen neueste Erkenntnisse zum immunologischen Gedächtnis der NK-Zellen in der Maus, dass (i) Memory-NK-Zellen nach dem Kontakt mit chemischen Reizstoffen oder virusähnlichen Partikeln induziert werden, (ii) antigenspezifische Memory-NK-Zellen nach einer MCMV-Infektion induziert werden, und (iii) Memory-NK-Zellen sich durch alleinige Stimulation mit Zytokinen entwickeln (siehe Abb. 3).

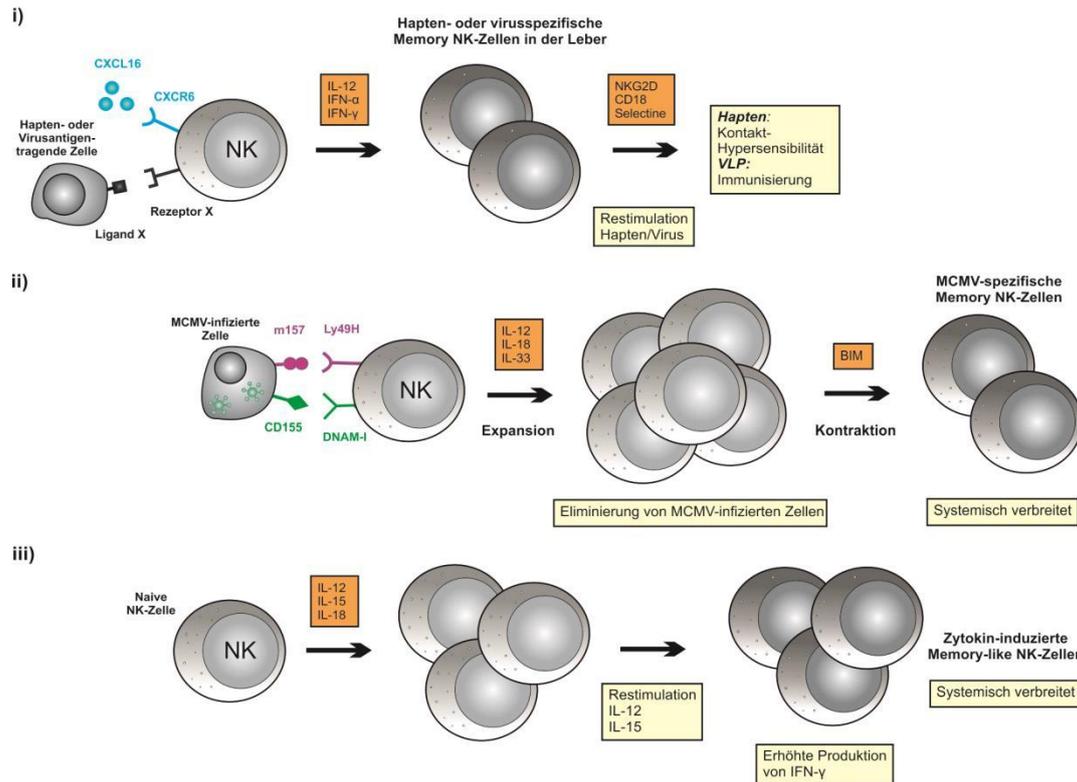


Abbildung 3: Signalwege für die Generierung von Memory-NK-Zellen. Die Induktion von (i) Hapten- oder virusspezifischen Memory-NK-Zellen nach dem Kontakt mit chemischen Reizstoffen oder virusähnlichen Partikeln (VLP); (ii) MCMV-spezifischen Memory-NK-Zellen nach einer MCMV-Infektion; (iii) Zytokin-induzierten Memory-like NK-Zellen nach Stimulation mit IL-12, 15, 18. Eigene Darstellung nach Cerwenka und Lanier, 2016.

3.3.1.1 Hapten- und virusspezifische Memory-NK-Zellen in der Leber

Als Kontakt-Hypersensibilität (CHS) wird eine immunologische Reaktion bezeichnet, welche in Folge einer lokalen Behandlung mit verschiedenen chemischen Reizstoffen auftritt. Es wurde zunächst angenommen, dass solche Reaktionen ausschließlich durch T- und B-Zellen vermittelt werden, bis demonstriert werden konnte, dass Mäuse, welchen T- und B-Zellen fehlten, mindestens gegen drei chemische Haptene Kontakt-Hypersensibilitäten ausbildeten: Dinitrofluorbenzol (DNFB), Pikrylchlorid und Oxazolone (O'Leary *et al.*, 2006). Diese Reaktion konnte bis zu vier Monate nach dem initialen Priming beobachtet werden (Paust *et al.*, 2010). Des Weiteren konnte keine Kontakt-Hypersensibilität in Hapten-sensibilisierten *Rag2*-Knockout-Mäusen, in denen NK-Zellen durch einen NK1.1-spezifischen Antikörper depletiert wurden, oder in Hapten-sensibilisierten *Rag2*- und *Il2R γ* -defizienten Mäusen, welchen neben T- und B-Zellen auch reife NK-Zellen fehlten, festgestellt werden (O'Leary *et al.*, 2006). Interessanterweise erbrachte der adoptive Transfer von NK-Zellen in *Rag* x *IL-2R γ* -defiziente Mäuse den Nachweis, dass CHS-vermittelnde NK-Zellen lediglich aus der Leber Hapten-sensibilisierter Mäuse isoliert werden konnten (Paust *et al.*, 2010).

Paust *et al.* zeigten in weiteren Experimenten, dass nach einer subkutanen Immunisierung von Mäusen mit nicht-infektiösen virusähnlichen Partikeln (VLPs), welche Proteine des Influenza-Virus, HIV-1 oder VSV enthielten, der Transfer von hepatischen NK-Zellen zu einer verlängerten Lebensdauer der Mäuse führte, die eine letale Dosis des selben Virus erhielten, mit dem sie sensibilisiert wurden im Vergleich zu den Mäusen, die mit einem anderen Virus sensibilisiert wurden (Paust *et al.*, 2010). Der gleiche Effekt konnte auch für das Vaccinia-Virus und das Herpes-simplex-Virus HSV-2 gezeigt werden (Gillard *et al.*, 2011; Abdul-Careem *et al.*, 2012).

3.3.1.2 MCMV-spezifische Memory-NK-Zellen

Nach der Identifizierung von leberständigen Memory-NK-Zellen im CHS-Modell, wurde das Konzept des NK-Zellgedächtnisses auf andere Organe und Krankheiten ausgeweitet. Die ersten Hinweise, dass NK-Zellen weitere antigenspezifische Effektorantworten ausüben, stammen aus einer Studie, in der das murine Cytomegalie-Virus (MCMV) untersucht wurde (Daniels *et al.*, 2001; Dokun *et al.*, 2001). Eine Subpopulation der NK-Zellen im Mausstamm C57BL/6 exprimiert den Ly49H-Rezeptor, welcher das MCMV-Protein m157 bindet, das auf der Zelloberfläche von virusinfizierten Zellen präsentiert wird. Es wurde gezeigt, dass Ly49H⁺ NK-Zellen in MCMV-infizierten Mäusen einer klonalen Expansion unterzogen wurden und dass diese Proliferation antigenspezifisch war, weil bei einer Infektion von mutanten Mäusen, welchen m157 fehlte, keine Expansion der Ly49H⁺ NK-Zellen stattfand (Dokun *et al.*, 2001; Bubic *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009). Ly49H ist ein Keimbahn-kodierter Rezeptor, welcher auf einem Großteil (ca. 40 – 50 %) der NK-Zellen in naiven Mäusen exprimiert wird. Aufgrund der mäßigen Expansion der Ly49H⁺ NK-Zellen in MCMV-infizierten Mäusen war die Relevanz dieser Effektorantwort für die adaptive Immunität zunächst unklar. Spätere Experimente demonstrierten, dass Keimbahn-kodierte MCMV-spezifische Rezeptoren auch in anderen Stämmen als dem der C57BL/6-Mäuse existierten, z.B. in BALB/c, NOD, und dass dort auch eine klonale Expansion von MCMV-spezifischen NK-Zellen beobachtet werden konnten (Pyzik *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde gezeigt, dass der adoptive Transfer weniger naiver NK-Zellen in Mäuse, welche keinen funktionierenden Ly49H-Rezeptor besaßen, zu einer Expansion der Donor- Ly49H⁺ NK-Zellen nach einer MCMV-Infektion führte (100 - 1000-fach) (Sun *et al.*, 2009). Darüber hinaus überdauerten die transferierten NK-Zellen über zwei Monate in den Empfänger-Mäusen, zeigten einen differenzierteren Phänotypen und reagierten effektiver gegenüber einer Restimulation als naive NK-Zellen, was über die IFN- γ -Sekretion und LAMP-1-Expression detektiert werden konnte. Bedeutsam ist auch, dass NK-Zellen aus MCMV-infizierten Mäusen effektiver darin waren, neonatale Mäuse vor einer MCMV-Infektion zu schützen als naive NK-Zellen, was eine Art von „abwehrendem“ NK-Zell-Gedächtnis nahelegt.

3.3.1.3 Zytokin-induzierte Memory-like NK-Zellen

NK-Zellen exprimieren eine Reihe von Rezeptoren für Zytokine wie IL-12, IL-15 und IL-18. Tatsächlich sind Zytokine alleine in der Lage, Memory-NK-Zellen mit Gedächtnis-ähnlichen Eigenschaften zu generieren (Cooper *et al.*, 2009). NK-Zellen aus Rag1-defizienten Mäusen wurden über Nacht *in vitro* mit den Zytokinen IL-12, IL-15 und IL-18 aktiviert und in Rag1-defiziente Empfänger-Mäuse transferiert. Ein Großteil der prä-aktivierten NK-Zellen war im Vergleich zu nicht prä-aktivierten NK-Zellen bis zu drei Wochen nach dem Transfer in der Lage, auf eine Restimulation mit einer erhöhten Produktion von IFN- γ zu reagieren. Diese starke Effektorantwort konnte durch eine Restimulation mit Zytokinen (IL-12 und IL-15) oder durch die aktivierenden Rezeptoren Ly49H und NK1.1 hervorgerufen werden. Interessanterweise zeigte sich die verstärkte Reaktion sowohl in Zellen, die sich nicht geteilt haben, als auch in Zellen, welche bereits eine Teilung durchlaufen haben. Weil diese NK-Zellen sich an eine frühere Aktivierung durch Zytokine erinnern, werden sie als „Zytokin-induzierte Memory-like (CIML-) NK-Zellen“ bezeichnet. Im Gegensatz zu den viralen antigenspezifischen Memory-NK-Zellen, zeigten diese Memory-like NK-Zellen eine gesteigerte zytotoxische Aktivität nach einer Restimulation (Cooper *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009). Es konnte zudem bewiesen werden, dass die Zytokin-induzierten Memory-like Effektorfunktionen der NK-Zellen nach homeostatischer Proliferation erhalten blieben (Keppel *et al.*, 2013). Ein weiteres Experiment erbrachte den Nachweis, dass Zytokin-induzierte Memory-like NK-Zellen *in vivo* mit CD4⁺ T-Zellen kooperieren und eine effektivere anti-tumorale Wirkung ausüben (Ni *et al.*, 2012).

3.3.2 Memory-NK-Zellen im Menschen

In Kenntnis dieser murinen Vorexperimente wurden auch humane NK-Zellen auf die Fähigkeit hin untersucht, Gedächtnis- oder Gedächtnis-ähnliche Antworten zu generieren. *In vivo* Studien im Menschen beschäftigen sich meistens mit zellulären Reaktionen gegenüber Infektionen und konnten so die Existenz von HCMV-spezifischen Memory-NK-Zellen beweisen. Ferner belegen *in vitro* Untersuchungen auch im Menschen die Existenz von Zytokin-induzierten Memory-like (CIML-) NK-Zellen.

3.3.2.1 HCMV-spezifische Memory-NK-Zellen

Interessanterweise sind NK-Zellen, welche den Keimbahn-kodierten Rezeptor NKG2C exprimieren, nicht oder nur in kleiner Anzahl im Blut von gesunden, HCMV-seronegativen Individuen vorzufinden. In Patienten, welche eine akute HCMV-Infektion durchmachten, traten NKG2C⁺ NK-Zellen in erhöhter Anzahl auf und reduzierten ihre Anzahl teilweise wieder, sobald der Patient die akute Phase überstanden hatte (Guma *et al.*, 2004; Lopez-Verges *et al.*, 2011; Della Chiesa *et al.*, 2012; Foley *et al.*, 2012).

Aufgrund dieser Studie wurde vermutet, dass NKG2C wahrscheinlich einen HCMV-spezifischen Rezeptor analog zu Ly49H in der Maus, darstellt. Nachfolgende Studien mit Patienten, welche sich mit HCMV infizierten, oder in welchen das Virus in Folge einer Immunsuppression durch eine Organ- oder hämatopoetische Stammzelltransplantation reaktiviert wurde, zeigten, dass die CD94-NKG2C⁺ NK-Zellpopulation bevorzugt während einer akuten HCMV-Infektion expandiert, daraufhin als Memory-NK-Zelle fortbesteht und in manchen Individuen bis zu 70 % der gesamten NK-Zellpopulation ausmacht (Lopez-Verges *et al.*, 2011; Della Chiesa *et al.*, 2012; Foley *et al.*, 2012). Zudem konnte nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation eine gesteigerte Effektorfunktion der CD94-NKG2C⁺ NK-Zellen aus HCMV-seropositiven Spendern als Antwort auf eine Re-Exposition gegenüber HCMV in HCMV-seropositiven Empfängern identifiziert werden, wobei CD94-NKG2C⁺ NK-Zellen aus HCMV-seronegativen Spendern diese Effektorfunktion nicht zeigten (Foley *et al.*, 2012). Die Expansion von CD94-NKG2C⁺ NK-Zellpopulationen konnte des Weiteren auch bei Infektionen mit anderen Viren, wie dem Hantavirus, HIV und HCV beobachtet werden, jedoch nur bei Individuen, welche anhaltend mit HCMV infiziert waren (Brunetta *et al.*, 2010; Bjorkstrom *et al.*, 2011; Beziat *et al.*, 2012).

3.3.2.2 Humane Zytokin-induzierte Memory-like NK-Zellen

Darüber hinaus belegen neue *in vitro* Untersuchungen an humanen NK-Zellen ebenfalls die Induktion von Memory-like NK-Zellen nach einer Zytokin-Aktivierung (Romee *et al.*, 2012). Mit Hilfe einer neuentwickelten Methode zur Langzeit-Kultur von humanen NK-Zellen konnte eine höhere Frequenz von prä-aktivierten IFN- γ -produzierenden humanen NK-Zellen nach Restimulation mit Zytokinen oder K562-Tumorzellen nachgewiesen werden – sogar nach der Zellteilung (Romee *et al.*, 2012). Diese gesteigerte Effektorfunktion trat sowohl bei CD56^{bright} als auch in CD56^{dim} NK-Zellpopulationen auf. Im Gegensatz zu den murinen Zytokin-induzierten Memory-like NK-Zellen, ist hier keine verstärkte Zytotoxizität zu beobachten. Um dieser Frage jedoch genauer nachzugehen, findet momentan eine klinische Studie der Phase-1 mit IL-12-, IL-15, IL-18-prä-aktivierten NK-Zellen in der Therapie von AML-Patienten statt (NCT01898793) (Cerwenka und Lanier, 2016).

3.4 NK-Zellen und ihre klinische Bedeutung in der Therapie von akuten Leukämien

NK-Zellen werden angesichts ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen zur Therapie von akuten kindlichen Leukämien eingesetzt. Aufgrund der ersten klinische Versuche zum Einsatz von Patienteneigenen autologen NK-Zellen, welche entweder *in vivo* mit IL-2 stimuliert oder *ex vivo* generiert und anschließend infundiert wurden, die keine oder nur wenige klinische Vorteile brachten, fokussierte sich die Forschung auf die Verwendung allogener Zellpräparate aus verwandten oder nicht-verwandten Spendern (Burns *et al.*, 2003; Baer *et al.*, 2008).

Zur Therapie einer Leukämieerkrankung werden nunmehr allogene Immunzellen transplantiert, welche die durch eine vorausgegangene Chemotherapie und Bestrahlung verringerte Zahl der Tumorzellen bis unterhalb eines kritischen Werts zu reduzieren sollen, was als „Graft versus Leukemia (GvL)“-Effekt beschrieben wird.

3.4.1 NK-Zell-Alloreaktivität und die allogene Zelltherapie

Spender-NK-Zellen, die einen inhibitorischen KIR-Rezeptor für denjenigen Liganden besitzen, welcher auf den Leukämiezellen des Patienten fehlt und welche keine Expression des inhibitorischen Heterodimers CD94/NKG2A aufweisen, werden als „alloreaktive“ NK-Zellen bezeichnet (A. Moretta *et al.*, 1990). Basierend auf der Analyse der 17 KIR-Gene und Pseudogene, werden zwei Spender-Haplotypen unterschieden: Haplotyp A-Spender exprimieren 6 inhibitorische KIRs (2DL1, 3, 4, 3DL1, 2 und 3) und den aktivierenden KIR 2DS4; wobei Haplotyp B-Spender zusätzlich zu den letztgenannten inhibitorischen KIRs einen oder mehrere der B-spezifischen Gene KIR2DS1, 2, 3, 5, KIR2DL2 und/oder KIR2DL5 exprimieren (Hsu *et al.*, 2002). Es existieren zwei Ansätze, um den anti-leukämischen Effekt alloreaktiver NK-Zellen auszunutzen. Ein Ansatz stellt die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen (HSZT) nach einer myeloablativen Chemotherapie und die damit verbundene permanente Bildung einer Spender-Hämatopoese sowie das permanente Engraftment von Spender-NK-Zellen inklusive des Spender-NK-KIR-Repertoires dar. Der andere Ansatz ist der adoptive NK-Zelltransfer aus alloreaktiven Spendern in Verbindung mit einer moderaten Lymphozyten-schädigenden Chemotherapie. Hier werden die transferierten allogenen NK-Zellen ohne die Bildung einer Spender-Hämatopoese vorübergehend im Empfänger expandiert.

3.4.1.1 Die allogene Stammzelltransplantation

Eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation wurde erstmals 1968 bei einem Geschwisterpaar durchgeführt. In den darauf folgenden Jahren wurden mehrere im Endstadium befindliche Leukämie-Patienten mit einer Knochenmarktransplantation von HLA-identen Geschwistern nach einer Ablation des Knochenmarks (durch eine vorausgehende Ganzkörperbestrahlung in Kombination mit Zytostatika) erfolgreich behandelt. Der Behandlungserfolg einer allogenen HSZT hängt demnach entscheidend von einer geeigneten Anpassung der MHC- bzw. HLA-Antigene zwischen Empfänger und Spender ab. Für diejenigen Patienten, welche keinen passenden HLA-identen Spender finden können, ist die haploidentische Transplantation eine geeignete Behandlungsmöglichkeit. Dabei handelt es sich bei dem Spender um ein verwandtes Familienmitglied, bei welchem nur ein HLA-Haplotyp mit dem des Empfängers identisch ist und der HLA-Klasse-I- und Klasse-II-Lokus des anderen, nicht vererbten Haplotyps, unterschiedlich ist (50 % HLA-Mismatch). Infrage kommen aber auch nicht-verwandte Spender, die lediglich einen partiellen HLA-Mismatch aufweisen.

Bei einer Transplantation hämatopoetischer Stammzellen kommt es zudem nach der Hypothese des „KIR-Ligand-Mismatch“ zu einer Alloreaktivität, wenn Spender und Empfänger im Sinne der KIR-Liganden fehlangepasst sind, also Spender NK-Zellen einen einzelnen inhibierenden KIR-Rezeptor für HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, die im Empfänger fehlen. Unter diesem Gesichtspunkt stellt der KIR-Ligand-Mismatch eine vielversprechende Strategie dar, um die GvL-Effekte der NK-Zellen bei einer HSZT zu steigern. Bei einer haploidentischen HSZT wird eine *ex vivo*-Depletion der T-Zellen (CD3, CD3/CD19 oder TZR $\alpha\beta$) aus dem zu transplantierenden Knochenmark durchgeführt, welche sonst zu einer „Graft versus Host“-Erkrankung (GvHD) führen können (Handgretinger *et al.*, 2016). Hierbei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Empfängers und den T-Zellen des Spenders, welche massive akute sowie auch chronische Gewebeschädigungen zur Folge haben können (Shlomchik *et al.*, 1999). Da bei einer Depletion der T-Zellen in einer haploidentischen HSZT der GvL-Effekt der T-Zellen ausbleiben würde, wurde vermutet, dass die T-Zell-depletierten Transplantate keine vollständige Remission in den Leukämie-Patienten erreichen würden. Jedoch konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen die zytotoxische Funktion der T-Zellen übernehmen, während sie gar keine oder nur in geringem Umfang eine GvHD auslösten (Ruggeri *et al.*, 1999; Ruggeri *et al.*, 2002; Velardi *et al.*, 2002). Eine Untersuchung von ca. 90 haploidentischen Transplantationen an erwachsenen Hochrisiko-AML-Patienten ergab einen signifikanten Überlebensvorteil derjenigen Patienten, deren NK-Zellen eine Alloreaktivität aufgrund eines KIR-Ligand-Mismatch gegenüber den Empfänger-Tumorzellen aufwiesen (Ruggeri *et al.*, 2006). Bei erwachsenen ALL-Patienten konnte hingegen kein vergleichbarer Vorteil beobachtet werden.

3.4.1.2 Der adoptive NK-Zelltransfer

Neben den GvL-Effekten der NK-Zellen, welche sich aus einem Stammzelltransplantat entwickeln, gilt der adoptive NK-Zelltransfer als praktikable und sichere Therapieoption. In einer klinischen Studie wurden erwachsene, Lymphozyten-depletierte AML-Patienten mit *ex vivo* expandierten haploidentischen NK-Zellen sowie *in vivo* mit der Gabe von IL-2 behandelt, um die NK-Zellfunktionalität zu steigern (Miller *et al.*, 2005). Bemerkenswerterweise blieben die NK-Zellen in jenen Patienten bestehen und expandierten, die eine intensive Vorbehandlung erhielten und hohe intrinsische IL-15-Konzentration aufwiesen (Miller *et al.*, 2005). Eine Pilotstudie mit 10 Kindern, welche an einer AML mit günstiger Prognose litten, zeigte, dass die Kombination niedrig-dosierter Immunsuppression mit adoptivem Transfer von KIR-Ligand-mismatched NK-Zellen und einer *in vivo* IL-2 Behandlung nach einer Standard-Chemotherapie erfolgreich mit dem Überleben aller 10 Studienteilnehmer einherging (Rubnitz *et al.*, 2010).

In einer weiteren Studie mit 8 Kindern, welche an einer prognostisch ungünstigen AML, ALL und T-ALL erkrankt waren, konnte die Praktikabilität der Gabe von *ex vivo* IL-15-stimulierten CD3/CD19-depletierten Stammzellpräparaten, welche eine hohe Zahl an NK-Zellen enthielten, im haploidentischen Modell demonstriert werden (Pfeiffer *et al.*, 2012). Alternativ können die NK-Zellen vor einem adoptiven Transfer auch *ex vivo* expandiert werden: Zum einen über die Stimulation mit Zytokinen, oder zum anderen durch die Aktivierung mit mbIL15-41BBL-exprimierenden K562-Transfektanten (Fujisaki *et al.*, 2009). Obwohl bisher nur wenige klinische Daten vorliegen, stellt der adoptive NK-Zelltransfer eine vielversprechende Therapiestrategie zur Behandlung kindlicher BCP-ALL dar.

4. ZIELE DER ARBEIT

NK-Zellen werden zur Therapie von akuten kindlichen Leukämien eingesetzt, da sie eine zytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen ausüben. Es beschäftigen sich derzeit eine Reihe von Studien damit, adoptive NK-Zelltransfer-Therapien zu verbessern, indem sie sich das Potenzial naiver NK-Zellen zu Nutze machen, aktiviert und expandiert werden zu können. Trotz der verbreiteten Meinung, dass das angeborene Immunsystem kein immunologisches Gedächtnis besitzt, widersetzen sich NK-Zellen der konventionellen Zweiteilung in eine adaptive und angeborene Immunität, indem ihnen bereits eine erhöhte Lebensdauer sowie verstärkte Effektorantworten nachgewiesen werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die adaptiven Eigenschaften von NK-Zellen in Folge eines Tumor-Primings mit BCP-ALL-Tumorzellen untersucht werden, um die bisher moderaten GvL-Effekte der NK-Zellen in der Therapie von akuten kindlichen lymphatischen B-Zell Vorläufer-Leukämien steigern zu können.

5. MATERIAL UND METHODEN

5.1 Allgemeine Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien waren von höchster Reinheit („pro analysi“) und wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen AppliChem (Darmstadt), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) oder Sigma-Aldrich (München) bezogen. Ergänzend wurden weitere Reagenzien und Labormaterialien verwendet, auf welche in den entsprechenden Abschnitten separat verwiesen wird.

5.2 Zellkultur

5.2.1 Zelllinien und primäre Leukämien

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

Tabelle 3: Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung (DSMZ)	Medium
K562	Humane CML in Blastenkrise, etabliert von einer 53-jährigen Frau im Jahr 1970. Exprimiert keine MHC-Klasse-I-Moleküle.	Komplettes RPMI 1640 Medium
K562-mbIL15-4-1BBL	Generiert durch die Transduktion von K562 mit Konstrukten, welche eine membrangebundene Form von IL-15 (IL-15 + CD8 α Transmembrandomäne) und humanem 41BB Ligand enthalten (Imai <i>et al.</i> , 2005; Fujisaki <i>et al.</i> , 2009).	Komplettes RPMI 1640 Medium
NK-92	NK-Zell-Lymphom, etabliert aus dem peripheren Blut eines 50-jährigen Mannes im Jahr 1992.	MEM-alpha GlutaMax + 20 % FCS + 1 % Penicillin/Streptomycin + 100 U/ml IL-2
NALM-16	B-Zell Vorläufer- (BCP-) Leukämie, etabliert von einem 5-jährigen Mädchen mit ALL im Jahr 1990.	Komplettes RPMI 1640 Medium
KASUMI-1	AML, etabliert von einem 7-jährigen Jungen im Jahr 1989.	Komplettes RPMI 1640 Medium + 20 % FCS
P3B	Anonymisierte primäre BCP-ALL eines 6-jährigen Mädchens mit 2. Rezidiv im Jahr 2013.	Komplettes RPMI 1640 Medium + 20 % FCS
P31G	Anonymisierte primäre BCP-ALL eines 9-jährigen Jungen im Jahr 2012.	Komplettes RPMI 1640 Medium + 20 % FCS

5.2.2 Reagenzien und Equipment

Tabelle 4: Reagenzien und Equipment für die Zellkultur

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
Zellkulturflaschen und -platten	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Polystyrol FACS Röhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Kryoröhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Dulbecco's Phosphatgepufferte Salzlösung (DPBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Einfrierbox „Mr. Frosty“	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco/Life Technologies GmbH, Ober-Ulm, Deutschland
Bicoll (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Humanserum "Off the Clot" AB (HuS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI-Medium1640	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
MEM Alpha (1x) + GlutaMax Medium	Gibco/Life Technologies GmbH, Ober-Ulm, Deutschland
Gefrorenes Frischplasma (FFP)	Zentrum für Klinische Transfusionsmedizin (ZKT), Tübingen, Deutschland
Rekombinates humanes IL-2 (Proleukin® S)	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Rekombinates humanes IL-12	PeproTech GmbH, Hamburg, Deutschland
Rekombinates humanes IL-15	CellGenix GmbH, Freiburg, Deutschland
Rekombinates humanes IL-18	MBL, Nagoya, Japan
Alburex5, Humanalbumin 50 g/l	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
Venor® GeM classic Kit	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
EasySep™ Human CD56 Positive Selection Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit I	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
EasySep™ Human NK Enrichment Kit	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
"The Big Easy" EasySep™ Magnet	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
EasySep™ Violet Magnet	STEMCELL Technologies, Grenoble, Frankreich
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Inkubator HERACell	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Inversmikroskop Olympus IX50	Olympus Europa SE & Co. KG , Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotina 420R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Kühlzentrifuge Hettich Rotixa 50RS	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Tischzentrifuge Hettich Mikro 22R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Wasserbad Modell 1002	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Neubauer <i>improved</i> Zählkammer	Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
GammaCell 1000 Elite	MDS-Nordion Inc., Ottawa, Kanada
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland

5.2.3 Medien und Puffer

Tabelle 5: Medien und Puffer für die Zellkultur

Medium/Puffer	Zusammensetzung
EasySep™-Puffer	2 % FCS 0,4 % 250 mM EDTA in PBS
Einfriermedium	20 % DMSO 80 % Humanalbumin 50 g/l 1:1 mit Zellen in komplettem RPMI 1640 Medium
Komplettes RPMI 1640 Medium	10 % FCS 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin in RPMI 1640 Medium
NKAES-Medium	10 % FFP 100 U/ml Penicillin 100 U/ml Streptomycin 2 mM L-Glutamin in RPMI 1640 Medium

5.2.4 Standard Zellkulturmethoden

5.2.4.1 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl und Vitalität einer Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Neubauer *improved* Zählkammer bestimmt.

Hierzu wurde die Zellsuspension mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und in die Kammer transferiert. Die Anzahl der ungefärbten lebenden Zellen in den vier Hauptquadraten wurde gezählt und die Zellkonzentration entsprechend der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der Quadrate}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

5.2.4.2 Auftauen von Zellen

Die kryokonservierten Zellen wurden bei 37 °C in einem Wasserbad so lange erwärmt, bis nur noch ein kleiner Eiskristall vorhanden war. Anschließend wurden pro 1 ml Zellsuspension langsam 10 ml des entsprechenden RT-warmen Zellkulturmediums hinzugegeben. Danach wurden die Zellen bei 350 g für 10 min abzentrifugiert, gezählt und in warmem Zellkulturmedium ausgesät.

5.2.4.3 Einfrieren von Zellen

Bis zu 50×10^6 Zellen in 0,5 ml des entsprechenden Zellkulturmediums wurden für ein Kryoröhrchen auf Eis vorgekühlt und mit 0,5 ml des ebenfalls vorgekühlten Einfriermediums gemischt. Die Kryoröhrchen wurden befüllt und sofort in vorgekühlte Einfrierboxen mit einer definierten Kühlungsrate von -1 °C/min überführt. Nach der Lagerung üN bei -80 °C wurden die Zellen zur Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

5.2.4.4 Isolation peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMCs)

Die humanen Vollblutspenden wurden durch das Institut für Klinische und Experimentelle Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Tübingen bereitgestellt. Ferner gilt anzumerken, dass die Spender weder nach ihrer grundsätzlichen NK-Zell-Zytotoxizität, noch nach ihrer KIR-KIRL-Inkompatibilität ausgewählt wurden. Die Isolation der PBMCs erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation mit dem Trennmedium Ficoll-Hypaque. Hierzu wurde die Blutprobe entweder 1:1 mit warmem PBS verdünnt, oder unverdünnt auf den Ficoll geschichtet und bei 500 g für 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Danach wurden zuerst die Plasmaschicht und anschließend die zellhaltige Interphase sorgfältig abgenommen. Die somit isolierten mononukleären Zellen wurden abschließend in PBS überführt, gewaschen, gezählt und entsprechend des weiteren Versuchsablaufs ausgesät.

5.2.4.5 Isolation primärer NK-Zellen

Die NK-Zellen wurden über eine Negativ-Selektion mit Hilfe des EasySep™ Human NK Enrichment Kits und dem Big Easy EasySep™ Magneten aus peripheren mononukleären Blutzellen isoliert.

Hierzu wurden die PBMCs entsprechend des Herstellerprotokolls mit EasySep™-Puffer auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt und der EasySep™-Enrichment-Cocktail sowie die EasySep™-Magnetic Particles zugegeben. Nach einer kurzen Inkubation wurde das Polystyrol-Röhrchen mit dem Antikörper-Zellgemisch im Magneten platziert und das Röhrchen nach einer weiteren Inkubationszeit abgekippt, um die gewünschte ungebundene CD56⁺-NK-Zellfraktion zu erhalten. Die isolierten NK-Zellen wurden abschließend mit PBS gewaschen, gezählt und entsprechend des weiteren Versuchsablaufs ausgesät.

5.2.4.6 Depletion von T-Zellen

Die T-Zellen (CD3⁺) wurden über eine Positiv-Selektion mit Hilfe des EasySep™ Human CD3 Positive Selection Kit I und dem EasySep™ Violet Magneten entsprechend des Herstellerprotokolls wie in Punkt 5.2.4.5 aus den NK-Zellansätzen depletiert. Eine Depletion wurde durchgeführt, sofern die T-Zellfrequenz in den NK-Zellansätzen an Tag 6 > 3 % war.

5.2.4.7 Mykoplasmentest

Alle in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mit Hilfe des Venor® GeM classic Kits negativ für Mykoplasmen getestet. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.2.5 NKAES

Die Expansion von NK-Zellen wurde nach einem modifizierten Protokoll von Imai und Kollegen durchgeführt, welche das „NK cell activation and expansion system“ erstmals beschrieben (Imai *et al.*, 2005; Fujisaki *et al.*, 2009). Dazu wurden frisch isolierte PBMCs mit 100 Gy-bestrahlten K562-mbIL15-4-1BBL in einem Verhältnis von 1:1,5 und 100 U/ml IL-2 in NKAES-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ ko-kultiviert. Die NKAES-Zellen wurden alle 2-3 Tage gesplittet und 1:1 mit frischem Medium und Zytokinen versorgt. Nach 14 Tagen in Kultur wurden die NKAES-Zellen geerntet, und entweder eingefroren oder direkt in Experimenten verwendet.

5.2.6 Generierung von „Memory-like“ NK-Zellen

Das Tumor- bzw. Zytokin-Priming der NK-Zellen wurde entsprechend der Abb. 4 durchgeführt. Für das Tumor-Priming wurden die Tumorzellen (z.B. NALM-16) mit 100 Gy bestrahlt und an Tag -1 im Verhältnis 3:1 zu dem entsprechenden NK-Zell-Primingansatz gegeben. Für das Zytokin-Priming wurden die NK-Zellen an Tag -1 für 16 h mit den Zytokinen IL-12 (10 ng/ml) und IL-18 (50 ng/ml) prä-aktiviert (Romee *et al.*, 2012). Alle NK-Zell-Primingansätze wurden von Tag -1 an in komplettem RPMI 1640 Medium + 10 % HuS, IL-2 (100 U/ml) und IL-15 (1 ng/ml) kultiviert. Nach 16 h (Tag 0) wurden alle NK-Zell-Primingansätze 3x mit Zellkulturmedium gewaschen und in frisches Zellkulturmedium mit IL-2 und IL-15 überführt.

Weitere Medienwechsel mit frischen Zytokinen erfolgten an Tag 3 und an Tag 6. Überstieg die T-Zellfrequenz ($CD3^+CD56^-$) an Tag 6 3 %, so wurden alle NK-Zell-Primingansätze T-Zell-depletiert (siehe 5.2.4.6). Das Priming von primären, also frisch isolierten NK-Zellen sowie von NK-92 Zellen wurde an Tag -1 der Kultur, das Priming von NKAES-Zellen an Tag 7 des 14-tägigen Expansionsprotokolls durchgeführt.

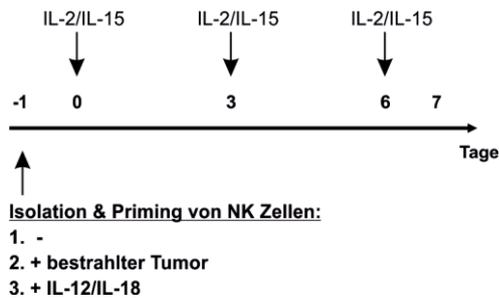


Abbildung 4: Generierung von „Memory-like“ NK-Zellen. Dargestellt ist das experimentelle Layout für die Induktion von „Memory-like“ NK-Zellen sowie deren Kulturbedingungen während den sieben Tagen nach Priming bzw. Präaktivierung.

5.3 Durchflusszytometrische Analysen und Ko-Kultur Experimente

5.3.1 Reagenzien und Equipment

Tabelle 6: Reagenzien und Equipment für die Durchflusszytometrie

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
Polystyrol FACS Röhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
Durchflusszytometer BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
ARD Succinimydyl Ester AF350	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
ARD Succinimydyl Ester Pacific Blue	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit	BioLegend GmbH, Fell, Deutschland
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit®	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Fix&Perm® Permeabilisierungs-Kit	An der Grub Bio Research GmbH, Wien, Österreich
privigen® Normales IgG vom Menschen (100 mg/ml)	CSL Behring GmbH, Marburg, Deutschland
BD Pharmingen FITC-BrdU Flow Kit	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Leukocyte Activation Cocktail, with GolgiPlug™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Golgi-Plug™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Binding Buffer for Annexin V (10x)	Affymetrix eBioscience, Frankfurt a. M., Deutschland

FACS Clean®	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Flow®	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
FACS Rinse®	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

5.3.2 Puffer

Tabelle 7: Puffer für die Durchflusszytometrie

Puffer	Zusammensetzung
Blockierpuffer	Humanes IgG in FACS-Puffer mit der Endkonzentration 10 µg/ml
FACS-Puffer (FP)	2 % FCS 0,84 % 250 mM EDTA in PBS
10x Annexin V-Puffer	10 % Binding Buffer for Annexin V in ddH ₂ O
Färbe-Puffer	3 % FCS in PBS

5.3.3 Antikörper

Tabelle 8: Humane Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper (anti-human-)	Verdünnung	Bezugsquelle	Isotyp/Spezies	Klon
Annexin V 647	1:20	BioLegend	-	-
BrdU FITC	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	B44
CD3 FITC	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	SK7
CD3 PerCP	1:100	BD Biosciences	Maus IgG1	SK7
CD3 PE-CF594	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	UCHT1
CD10 PE-CF594	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	HI10A
CD16 AF700	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	3G8
CD19 APC	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	SJ25C1
CD25 FITC	1:10	BD Biosciences	Maus IgG1	2A3
CD34 PerCP	1:100	BD Biosciences	Maus IgG1	8G12

CD45 PE-Cy7	1:100	BD Biosciences	Maus IgG1	HI30
CD54 (ICAM-1) FITC	1:5	Beckman Coulter	Maus IgG1	84H10
CD56 Brilliant Violet 421	1:50	BioLegend	Maus IgG1	HCD56
CD56 Brilliant Violet 711	1:25	BioLegend	Maus IgG1	HCD56
CD57 PE	1:20	BD Biosciences	Maus IgM	NK-1
CD69 PerCP	1:10	BD Biosciences	Maus IgG1	L78
CD94 FITC	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	HP-3D9
CD107a APC	1:20	BD Biosciences	Maus IgG1	H4A3
CD112 PE	1:50	BioLegend	Maus IgG1	TX31
CD155 PE	1:20	BioLegend	Maus IgG1	SKII.4
CD158a/h/i PE (KIR2DL1/S1/S4)	1:10	BD Biosciences	Maus IgM	HP-3E4
CD158b1/b2/j PE (KIR2DL2/L3/S2)	1:50	Beckman Coulter	Maus IgG1	GL183
CD158e1/e2 PE (KIR3DL1/DS1)	1:50	Beckman Coulter	Maus IgG1	Z27.3.7
CD161 PE-Cy7	1:20	BD Biosciences	Maus IgG1	HP3G10
CXCR6 (CD186) Brilliant Violet 421	1:20	BioLegend	Maus IgG2a	K041E5
HLA-A,B,C PE	1:50	BioLegend	Maus IgG2a	W6/32
IFN-γ BUV395	1:20	BD Biosciences	Maus IgG1	B27
IFN-γ PE	1:50	BD Biosciences	Maus IgG1	B27
KLRG1 AF647	1:100	Prof. Pircher, Freiburg	Maus IgG2a	13F12F2
NKG2A (CD 159a) PECy7	1:25	Beckman Coulter	Maus IgG2b	Z199
NKG2C (CD159c) PerCP	1:10	R&D Systems	Maus IgG1	134591
NKG2D (CD314) APC	1:25	Miltenyi Biotec	Maus IgG1	BAT221
NKp30 (CD337) PE	1:50	Beckman Coulter	Maus IgG1	Z25
NKp44 (CD336) PE	1:25	Beckman Coulter	Maus IgG1	Z231
NKp46 (CD335) APC	1:10	BD Biosciences	Maus IgG1	9-E2
Perforin Pacific Blue	1:20	BioLegend	Maus IgG2b	dG9
TNFα Brilliant Violet 605	1:20	BioLegend	Maus IgG1	MAB11

Tabelle 9: Murine Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper (anti-murin-)	Verdünnung	Bezugsquelle	Isotyp/Spezies	Klon
CD45 APC-eFluor 780	1:50	eBioscience	Ratte IgG2b	30-F11
F(ab') ₂ RPE	1:50	Sigma-Aldrich	Schaf	Polyklonal

Tabelle 10: Isotypkontrollen für die Durchflusszytometrie

Isotyp Kontrolle	Bezugsquelle	Spezies	Klon
IgG1 κ AF700	ExBio	Maus	MOPC-21
IgG1 κ APC	BD Biosciences	Maus	MOPC-21
IgG1 κ Brilliant Violet 605	BioLegend	Maus	MOPC-21
IgG1 κ Brilliant Violet 421	BD Biosciences	Maus	X40
IgG1 κ BUV395	BD Biosciences	Maus	X40
IgG1 κ FITC	BD Biosciences	Maus	MOPC-21
IgG1 κ PE	BD Biosciences	Maus	MOPC-21
IgG1 κ PE-Cy7	BD Biosciences	Maus	MOPC-21
IgG1 κ PerCP	BD Biosciences	Maus	MOPC-21
IgG2a κ AF647	BioLegend	Maus	MOPC-173
IgG2a κ Brilliant Violet 421	BioLegend	Maus	MOPC-173
IgG2a κ Brilliant Violet 605	BioLegend	Maus	MOPC-173
IgG2a κ PE	Immuno Tools	Maus	PPV-04
IgG2b κ Pacific Blue	BioLegend	Maus	MPC-11
IgG2b κ PE-Cy7	BioLegend	Maus	MPC-11
IgM κ PE	BD Biosciences	Maus	G155-228

Tabelle 11: Humane unkonjugierte Antikörper für die Durchflusszytometrie

Antikörper (anti-human-) pan-NKG2D-L:	Verdünnung	Bezugsquelle	Isotyp	Klon
MICA	1:100	Prof. Steinle, Frankfurt	Maus IgG1	AMO1

MICB	1:50	Prof. Steinle, Frankfurt	Maus IgG1	BMO1
ULBP1	1:100	Prof. Steinle, Frankfurt	Maus IgG1	AUMO3
ULBP2	1:100	Prof. Steinle, Frankfurt	Maus IgG1	BUMO1
ULBP3	1:100	Prof. Steinle, Frankfurt	Maus IgG1	CUMO3

5.3.4 Versuchsdurchführung

5.3.4.1 Färbung von Oberflächenantigenen mit direktmarkierten Primärantikörpern

Für die Oberflächenfärbung wurden die benötigten Zellen (ca. 1×10^6) ausgezählt und in 50 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Hierzu wurden die jeweiligen Antikörper in der entsprechenden Verdünnung pipettiert und entweder 10 min bei RT, oder 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend erfolgte zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen eine Färbung mit einem Lebend-/Tot-Farbstoff (siehe 5.3.4.3).

5.3.4.2 Färbung von Oberflächenantigenen mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern

Die Blockierung von unspezifischen Bindestellen wurde für 30 min bei RT durchgeführt. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen in 100 μ l Blockierpuffer resuspendiert, nach der Inkubation bei 400 g für 5 min zentrifugiert und in 50 μ l frischem Blockierpuffer aufgenommen. Die Primärantikörper wurden in der entsprechenden Verdünnung hinzugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit FACS-Puffer gewaschen und in 50 μ l FACS-Puffer mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper anti-murin-F(ab')₂ RPE für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Optional konnte anschließend noch eine Oberflächenfärbung, wie in Punkt 5.3.4.1 beschrieben, angeschlossen werden.

5.3.4.3 Zellfärbungen mit ARD Lebend-/Tot-Farbstoffen

Für die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen, wurden diese nach Färbung der jeweiligen Antigene mit PBS gewaschen und mit einem Lebend-/Tot-Farbstoff, wie z.B. ARD Succinimydyl Ester AF350, entsprechend den Herstellerangaben für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen 3x mit FACS-Puffer gewaschen und entweder sofort auf dem BD LSR II analysiert, oder für eine spätere Analyse mit 0,5 % PFA in FACS-Puffer fixiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 400 g für 5 min. Für die anschließende Analyse wurden Dubletten anhand ihres charakteristischen Vorwärts- und Seitwärtsstreulichts (FSC und SSC) ausgeschlossen und vitale Zellen über die Amin-reaktiven Lebend-/Tot-Farbstoffe selektiert.

5.3.4.4 *In vitro* Zytotoxizitätsassay

Für die Bestimmung der *in vitro* Zytotoxizität der NK-Zellen, wurden die dafür benötigten Targetzellen (z.B. die BCP-ALL Zelllinie NALM-16) mit 0,5 µM CFSE in PBS für 15 min bei 37 °C markiert. Die CFSE-markierten Targetzellen wurden anschließend mit dem entsprechenden warmen Zellkulturmedium gewaschen, abschließend in frischem Zellkulturmedium resuspendiert und üN bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die NK-Zellen und die CFSE-markierten Targetzellen gezählt, auf 1×10^6 /ml eingestellt und für 5 h bei 37 °C in 96-well Rundbodenplatten ko-inkubiert. Primäre Leukämien wurden zunächst über eine Dichtegradientenzentrifugation mit dem Trennmedium Ficoll-Hypaque aufgereinigt und anschließend als Targetzellen eingesetzt. Die Ko-Inkubation erfolgte in Triplikaten in den Verhältnissen (E:T) zwischen 9:1 (180 000 NK-Zellen und 20 000 Targetzellen) und 1:3 (50 000 NK-Zellen und 150 000 Targetzellen) mit einem Endvolumen von 200 µl des entsprechenden NK-Zellkulturmediums. Zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wurden die Kokulturen nach den 5 h mit PBS gewaschen und mit dem Lebend-/Tot-Farbstoff Succinimydyl Ester Pacific Blue für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 400 g für 5 min. Um den spontanen Tod von Targetzellen auszuschließen, wurden fünf Monokulturkontrollen in jedes Experiment miteinbezogen. Die spezifische Lyse der Targetzellen in Prozent errechnet sich wie folgt:

$$\frac{\%CFSE^+PB^+tote\ Targets - \%CFSE^+PB^+spontan\ tote\ Targets}{(100 - \%CFSE^+PB^+spontan\ tote\ Targets)} \times 100\ %$$

5.3.4.5 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse wurde mit Hilfe des BD Pharmingen FITC-BrdU Flow Kits durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen am Vortag der Analyse gezählt, auf 5×10^5 in 250 µl komplettem Zellkulturmedium, inklusive IL-2 und IL-15, eingestellt und mit 0,1 mM bzw. 10 µM/ml BrdU für 16 h bei 37 °C in einer 48-well Platte im Brutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die kompletten 250 µl Zellsuspension zur Färbung der Oberflächenantigene mit Färbe-Puffer gewaschen, in 50 µl Färbe-Puffer aufgenommen und der Oberflächen-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 15 min auf Eis im Dunkeln, wurden die Zellen erneut mit Färbe-Puffer gewaschen, in 100 µl Cytofix/Cytoperm-Puffer resuspendiert und für 25 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Perm/Wash-Puffer gewaschen, in 100 µl Cytoperm Plus-Puffer aufgenommen und für 5 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Die DNase Behandlung in 50 µl PBS (150 µg/ml) für 1 h bei 37 °C im Brutschrank erfolgte nach einem weiteren Waschschrift mit Perm/Wash-Puffer. Die Zellen wurden danach erneut mit Perm/Wash-Puffer gewaschen und mit dem anti-BrdU-FITC Antikörper 1:50 in 50 µl Perm/Wash-Puffer für 20 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit 7-AAD- Perm/Wash-Puffer (7-

AAD 1:50 in Perm/Wash-Puffer) gewaschen und in 100 µl 7-AAD-Färbepuffer (7-AAD 1:50 in Färbepuffer) zur Analyse aufgenommen. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 300 g für 5 min.

5.3.4.6 Viabilitätsassay

Zur Bestimmung der Viabilität wurden $2,5 \times 10^5$ der Zellen direkt aus Kultur in Zellkulturmedium in eine 96-well Rundbodenplatte überführt und mit frisch verdünntem 1x Annexin V-Puffer aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation bei 400 g für 5 min, wurden die Ansätze mit 1x Annexin V-Puffer gewaschen und erneut bei 400 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 50 µl Annexin V-Puffer resuspendiert, die entsprechenden Oberflächen- sowie der Annexin V-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung hinzugegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Abschließend wurde den Ansätzen 7-AAD in der Verdünnung 1:50 zugesetzt und diese sofort analysiert.

5.3.4.7 Bestimmung der funktionellen NK-Zellantwort

Für die Analyse der funktionellen NK-Zellantwort wurden die NK-Zellansätze am Vortag in entsprechendem komplettem Zellkulturmedium mit 200 U/ml IL-2 im Brutschrank $\bar{u}N$ vor-inkubiert. Am Analysetag wurden die Ansätze gezählt und 5×10^5 Zellen in 100 µl komplettem, jedoch FCS-freiem, RPMI 1640 + 10 % Humanserum in eine 96-well Rundbodenplatte überführt. Anschließend wurde der Fluorochrom-gekoppelte CD107a-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung hinzugegeben und für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zu den NK-Zellansätzen wurde dann Golgi-Plug (1:250) und die entsprechenden Targetzellen im Verhältnis 1:3 (E:T) zugegeben. Nach einer Ko-Kultur von 6 h bei 37 °C im Brutschrank wurden die intrazellulären Antigene mit Hilfe des Fix&Perm[®] Permeabilisierungskits gefärbt. Für die intrazelluläre Färbung wurden neben Isotyp-Kontrollen auch sogenannte „Baseline“-Ansätze miteinbezogen, welche keine Targetzellen sondern nur Medium enthielten und auf welche die Ko-Kultur-Ansätze normalisiert wurden. Alle nachfolgenden Pipettier- und Zentrifugationsschritte erfolgten auf Eis. Zunächst wurden alle Ansätze zweimal mit FACS-Puffer gewaschen, anschließend in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und die Oberflächen-Antikörper in der entsprechenden Verdünnung für 20 min bei 4 °C hinzugegeben. Die Ansätze wurden erneut mit PBS gewaschen und eine Lebend-/Tot-Färbung mit 39,4 µM ARD Succinimydyl Ester AF350 durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen in 100 µl Caltac A resuspendiert und für 20 min bei 4 °C fixiert. Die Permeabilisierung und Färbung der intrazellulären Epitope erfolgte nach nochmaligem Waschen der Zellen mit FACS-Puffer in 100 µl Caltac B mittels der entsprechenden Antikörper für 45 min bei 4 °C. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und sofort analysiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 400 g für 5 min.

5.4 *In vivo* Methoden

5.4.1 NSG-Mäuse

Die NOD.Cg-Prkdc^{scid}IL2rg^{tmWjl}/SzJ, auch NOD-*scid* IL2Rgamma^{null} (NSG) genannten Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) bezogen, unter spezifisch-pathogen-freien (SPF-) Bedingungen an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen gehalten und gezüchtet. Die Tierversuche erfolgten gemäß den Genehmigungen der Tierversuchsanträge bzw. -anzeigen von PD Dr. Dr. Maya C. André durch das Regierungspräsidium Tübingen mit den folgenden Projekt-Nummern: K2/13 und §10a Anzeige vom 1.10.2012.

5.4.2 Reagenzien und Equipment

Tabelle 12: Reagenzien und Equipment für die *in vivo* Experimente

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
ACK Lysepuffer	Universitätsapotheke, Tübingen, Deutschland
Mausinjektionskäfig Typ B 32 mm 100680	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
Mausinjektionskäfig Typ C 25 mm 100690	G&P Kunststofftechnik, Kassel, Deutschland
BD Plastipak™ 1 ml Einmalspritze mit Kanüle 45 x 12,7 mm (26 G)	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Microlance Kanüle 27G x 3/4" 0,4 x 19 mm	BD, Heidelberg, Deutschland
Microvette 500 Kalium-EDTA	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb 45 µM	BD, Heidelberg, Deutschland
Kapillaren, Na-hep	Hirschmann GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland

5.4.3 Versuchsdurchführung

5.4.3.1 Induktion von patienten-spezifischen Leukämien in NSG-Mäusen

Für die Induktion von Leukämien wurden $1-5 \times 10^6$ leukämische Zellen aus Knochenmarkspunktionen von erstdiagnostizierten oder rezidivierenden Tübinger BCP-ALL-Patienten intravenös in die Schwanzvene von NSG-Mäusen injiziert (Woiterski *et al.*, 2013). Um das leukämische Engraftment in den Versuchstieren quantifizieren zu können, wurde peripher entnommenes murines Blut mittels Durchflusszytometrie und definierten humanen leukämischen Oberflächenantigenen analysiert. Die Versuchstiere wurden euthanasiert, sobald das Engraftment der Leukämie im peripheren Blut > 60 % betrug oder die Mäuse Anzeichen einer Leukämieerkrankung wie z.B. Gewichtsverlust, fahles Fell oder einen gekrümmten Rücken aufwiesen.

Nach dem Erlösen der Versuchstiere mittels CO₂, wurde das Knochenmark und die Milz präpariert, durchflusszytometrisch analysiert und die humanen Blasten entweder in neue Mäuse retransplantiert, oder in flüssigem Stickstoff für *in vitro* oder *in vivo* Experimente kryokonserviert.

5.4.3.2 Zellpräparationen

Zur Analyse von peripheren Blutzellen lebender Versuchstiere wurden diese unter einer CO₂/O₂ Gasmischung narkotisiert und Blut retrobulbär mit Hilfe einer heparinisierten Kapillare in eine EDTA-Microvette abgenommen. Für die Lyse der Erythrozyten wurde das periphere Blut in 5 ml ACK Lysepuffer für maximal 7 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Für die Endanalyse von Versuchstieren, wurden diese mittels CO₂ erlöst, das Knochenmark sowie die Milz präpariert und aus den Organen je eine Einzelzellsuspension mit Hilfe eines Zellsiebes hergestellt. Falls nötig wurden die Erythrozyten in der Milzzellsuspension mittels des ACK Puffers lysiert. Abschließend wurden die Zellen gegen definierte humane leukämische Oberflächenantigene gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

5.4.3.3 Adoptiver NK-Zelltransfer

Die primären Leukämiezellen des anonymisierten Spenders P3B wurden aufgetaut und an d0 4×10^6 intravenös in die Schwanzvene unbestrahlter NSG-Mäuse injiziert. Nach 6-8 h wurden 5×10^6 NK-Zellen der jeweiligen Ansätze intravenös in die Schwanzvene derselben Versuchstiere appliziert. An d17 wurden die Versuchstiere erlöst, das Knochenmark präpariert und jenes mittels Durchflusszytometrie und Antikörpern gegen definierte humane leukämische Oberflächenantigene analysiert.

5.4.3.4 Retransplantation

Für das Retransplantationsexperiment wurden Knochenmarkszellen der jeweiligen Gruppen aus den Präparationen des adoptiven NK-Zelltransfers vereinigt und an d0 20×10^6 intravenös in die Schwanzvene unbestrahlter NSG-Mäuse injiziert. Die Versuchstiere wurden nach 30 und 44 Tagen auf das Engraftment der Leukämie im peripheren Blut hin untersucht und schließlich an d58 erlöst. Das Knochenmark wurde präpariert und durchflusszytometrisch analysiert.

5.5 Immunzytochemie

5.5.1 Reagenzien und Equipment

Tabelle 13: Reagenzien und Equipment für die Immunzytochemie

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
Polystyrol FACS Röhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern, Deutschland
DPBS, Calcium- und Magnesiumfrei	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
BD Cytotfix/Cytoperm™	BD, Heidelberg, Deutschland
BD Perm/Wash™ Puffer	BD, Heidelberg, Deutschland
Rinderalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Corning 22 mm x 22 mm Deckglas	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
Konfokalplattform Leica TCS SP8	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Silane-Prep Slides	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

5.5.2 Antikörper und Farbstoffkonjugate

Tabelle 14: Antikörper und Farbstoffkonjugate für die Immunzytochemie

Antikörper bzw. Farbstoff	Verdünnung	Bezugsquelle	Spezies
Anti-human α -Tubulin, biotinyliert	1:50	Life Technologies	Maus
Streptavidin AF647	1:500	Life Technologies	-
Phalloidin AF568	1:150	Life Technologies	-
Anti-human Perforin AF488	1:50	BioLegend	Maus
ProLong Gold antifade mountant with DAPI	-	Life Technologies	-

5.5.3 Versuchsdurchführung

5.5.3.1 Konjugatbildung

Für die Bildung von Konjugaten wurden $4,5 \times 10^5$ NK-Zellen mit $1,5 \times 10^5$ NALM-16-Zellen für 15 min bei 37 °C in FACS-Röhrchen inkubiert. Die hier gebildeten NK-Zell/NALM-16-Konjugate wurden auf Silan-beschichtete Objektträger transferiert und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert.

Die Zellen wurden anschließend mit Calcium- und Magnesiumfreiem PBS gewaschen und mit Cytofix/Cytoperm™ für 20 min bei RT fixiert bzw. permeabilisiert. Danach wurden die Zellen mit 1x Perm/Wash™ Puffer + 2 % BSA gewaschen und mit anti-humanem, biotinyliertem α -Tubulin-Antikörper für 30 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x Perm/Wash™ Puffer + 2 % BSA wurden die Zellen mit Streptavidin AF647 für 30 min inkubiert. Eine letzte Färbung erfolgte nach erneutem Waschen mit 1x Perm/Wash™ Puffer + 2 % BSA mit Phalloidin AF568 und anti-humanem Perforin AF488 für 30 min. Abschließend wurden die Zellen zuerst mit 1x Perm/Wash™ Puffer + 2 % BSA und dann mit PBS gewaschen. Die Konjugate wurden mit Hilfe von Deckgläsern und ProLong Gold antifade mountant mit DAPI auf den Objektträgern eingedeckelt. Alle Färbungen wurden bei RT und in 1x Perm/Wash™ Puffer + 2 % BSA durchgeführt.

5.5.3.2 Konfokalmikroskopie

Alle Konfokalaufnahmen wurden mit Hilfe der Konfokalplattform Leica TCS SP8, des Leica HCX PL Apo 100x Ölimmersionsobjektivs und der „Leica LAS AF“ Software durchgeführt. Die Bildgebung erfolgte bei 12000 Hz, 512x512 Pixeln, einem Zoom-Faktor von 4 und einer Schichtdicke der Z-Stapel von 1 μ m.

5.5.3.3 Quantitative Analyse

Die quantitative Analyse wurde mittels der „Bitplane Imaris Image Analysis“ Software durchgeführt. Die lytischen perforinhaltigen Granula der NK-Zellen wurden über die „Spots“-Funktion, die immunologische Synapse als dichte, actinreiche Region über die „Surface“-Funktion identifiziert. Das MTOC wurde als hellster Punkt der Tubulinfärbung festgelegt. Die Distanz zwischen jedem Granulum und dem MTOC wurde als Distanz zwischen dem Mittelpunkt des Granulums und der nächstliegenden Oberfläche des MTOCs mit Hilfe der „Distance transformation“-Funktion berechnet. Die Distanz zwischen dem MTOC und der immunologischen Synapse wurde als Distanz zwischen dem Mittelpunkt des MTOCs und der nächstliegenden Synapsenoberfläche berechnet.

5.6 Transkriptom

5.6.1 Reagenzien und Equipment

Tabelle 15: Reagenzien und Equipment für die Transkriptomanalyse

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
NanoDrop2000	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG,

	Waldbronn, Deutschland
Agilent RNA 6000 Nano Gesamt RNA Assay	Agilent Technologies Deutschland GmbH & Co. KG, Waldbronn, Deutschland
GeneChip® Instrument System	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom
Human Genome U133Plus 2.0 GeneChip	Affymetrix UK Ltd., High Wycombe, United Kingdom

5.6.2 Analyse

Die Isolation der totalen RNA aus den NK-Zellansätzen erfolgte an d7 mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Die Konzentration der Proben wurde am NanoDrop2000 bestimmt und auf 30 ng/µl eingestellt. Insgesamt wurden zur Transkriptomanalyse 500 ng RNA verwendet. Diese wurde vor dem Transfer auf den Chip einer Qualitätskontrolle und einer erneuten RNA-Quantifizierung am Agilent 2100 Bioanalyzer mit Hilfe des Agilent RNA 6000 Nano Gesamt RNA Assays unterzogen. Schließlich wurden die RNA-Proben auf den U133Plus 2.0 GeneChip transferiert. Die totale RNA der NK-Zellen wurde hier zunächst revers in cDNA transkribiert, nachfolgend in Biotin-markierte cRNA transkribiert, fragmentiert und auf den Array hybridisiert. Die Detektion der Biotin-markierten, an den Array gebundenen RNA-Fragmente, erfolgte nach einer Streptavidin-Cy5-Färbung mittels des GeneChip® Instrument Systems. Die Hintergrundkorrektur und Normalisierung der Expressionsdaten wurde nach der GC-RMA-Methode, die log-Transformation über die Bioconductor Pakete „affy“ und „simpleaffy“ durchgeführt.

5.7 Q-RT-PCR

5.7.1 Reagenzien und Equipment

Tabelle 16: Reagenzien und Equipment für die q-RT-PCR

Reagenz/Produkt	Bezugsquelle
NanoDrop2000	Thermo Fischer Scientific GmbH, Ulm, Deutschland
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Stockach, Deutschland
LightCycler® 480	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz

5.7.2 Primer

Tabelle 17: Primer für die q-RT-PCR

Gen	Primer 5' → 3'	Primer 3' → 5'	Amplikon
ACTB	tccctggagaagagctacga	aggaaggaaggctggaagag	98
PDHB	GGTTTCCCATCAAGACCTG	TGGTTTCCATGTCCATTGGT	119
SDHA	agaagcccttgaggagca	cgattacgggtctatattccaga	93
CXCR6	gcaagctcatctctggaaca	CCACAGACAAACACCACCAG	197
HDAC9	GACGCTTAGGCAAGGTGTTC	gggaactccacCAGCTACAA	184
IFNG	TGACCAGAGCATCCAAAAGA	gcgacagttcagccatcac	179
IL17RA	Gggcctggaagtgaaaaatac	AACTGGGCGAATTCAGGAC	158
IRF5	actccgcctcatctacgac	aggcttgcaacatcctct	175
KIR2DL	GGTCTTCTTGACCAGAGTG	acagggaccccatcttctt	169
NCR2	TCACAGACCCAGACCCAGA	cgaggagtccacagaacaca	163
PDGFA	tgaggattcttgacaccag	CGAGGAATCTCGTAAATGACC	156
TNFSF9	agctggtgcccataaatg	GCCGCAGCTCTAGTTGAAAG	171

5.7.3 Versuchsdurchführung

Zur Validierung der Transkriptomdaten mittels q-RT-PCR wurde dieselbe NK-Zell-RNA wie in der Transkriptomanalyse verwendet. Hierfür erfolgte die Isolation der totalen RNA aus den NK-Zellansätzen an d7 mit Hilfe des RNeasy Mini Kits. Die Konzentration der Proben wurde am NanoDrop2000 bestimmt und auf 30 ng/μl eingestellt. Die cDNA-Synthese wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit aus 300 ng RNA durchgeführt. Die q-RT-PCR erfolgte mittels des QuantiTect SYBR Green PCR Kits am LightCycler® 480.

5.8 Software

Tabelle 18: Verwendete Software

Anwendungsgebiet	Name, Version	Hersteller
Textbearbeitung	Microsoft Word 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland
Bildbearbeitung	CorelPHOTO-Paint X6	Corel GmbH, München, Deutschland
	CorelDRAW X6	Corel GmbH, München, Deutschland
	Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems Software, Dublin, Irland
Durchflusszytometrie	BD FACSDiva Software 6.1.3	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	BD FACSDiva Software 8.0.1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	FCS Express 4.0.23.0	De Novo Software, Glendale, USA
Bildverarbeitung	Imaris 7.7.2 Image analysis Software	Bitplane AG, Zürich, Schweiz
	Leica LAS AF Software	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar, Deutschland
Transkriptom	Bioconductor 3.3 Pakete „affy“ & „simpleaffy“	Bioconductor, Dortmund, Deutschland
	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)	National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, USA
	qbasePLUS	Biogazelle, Gent, Belgien
Diagramme und Statistik	Microsoft Excel 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Stuttgart, Deutschland
	GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Fay Avenue, USA

5.9 Statistik

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde, soweit nicht anders vermerkt, ein zweiseitiger ungepaarter t-Test durchgeführt.

6. ERGEBNISSE

6.1 Ein Tumor-Priming führt zu einer gesteigerten und langanhaltenden Zytotoxizität *in vitro*

NK-Zellen werden aufgrund ihrer zytotoxischen Aktivität gegenüber Tumorzellen zur Therapie von akuten kindlichen Leukämien eingesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten die adaptiven Eigenschaften der NK-Zellen hinsichtlich neuer Therapiestrategien von akuten lymphatischen B-Zell Vorläufer-Leukämien (BCP-ALL) untersucht werden. Hierzu wurden frisch isolierte primäre NK-Zellen mit bestrahlten Zellproben von BCP-ALL Zelllinien, sowie primären BCP-ALL Patientenblasten geprimed und danach sieben Tage mit geringen Konzentrationen der GMP-konformen Zytokine IL-2 und IL-15 kultiviert, um deren zytotoxische Aktivität gegenüber den ursprünglich für das Priming verwendeten Leukämiezellen an Tag 7 zu analysieren. Während NALM-16 eine eingehend charakterisierte BCP-ALL Zelllinie darstellt, wurden die beiden anonymisierten primären Leukämien P3B und P31G anhand ihres klinischen Verlaufs als kindliche Hochrisiko-BCP-ALL definiert. Der Patient P31G erfuhr insgesamt drei Rezidive; der Patient P3B verstarb nach dem 2. Rezidiv. Die primären Leukämien P3B und P31G wurden vor der Verwendung in Experimenten in NSG-Mäusen induziert und expandiert (siehe Methoden 5.4.3.1). Durchflusszytometrische Analysen zum Phänotypen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und primären Patientenblasten ergaben einen Unterschied hinsichtlich der Expression von wichtigen NK-Zellrezeptor-Liganden wie NKG2D-L, ICAM-1, HLA-E, HLA-ABC und den DNAM-1-Liganden CD112 und CD155 (siehe Abb. 5).

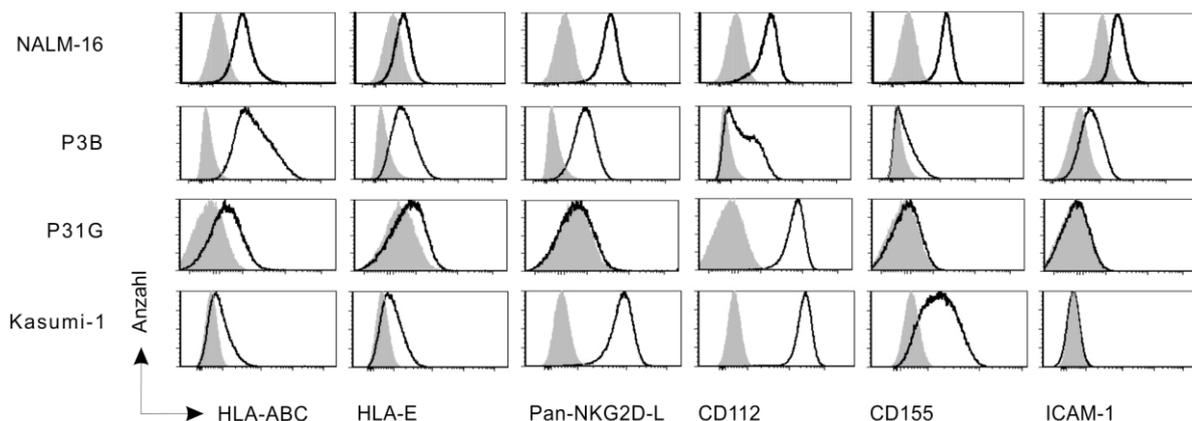


Abbildung 5: Phänotypische Charakterisierung des NK-Zell-Ligandenrepertoires verschiedener Leukämiezellen. Durchflusszytometrische Charakterisierung der Expression von HLA-Klasse-I, ICAM-1, sowie den DNAM-1-(CD112 und CD155) und NKG2D-Liganden (NKG2DL) der pädiatrischen Zelllinien NALM-16 (BCP-ALL) und KASUMI-1 (AML) sowie der primären BCP-ALL-Proben P3B und P31G. Pan-NKG2D-L gibt die Analyse der NKG2D-Liganden mit einem Cocktail bestehend aus anti-MICA, anti-MICB und anti-ULBP1-3 Antikörpern wieder (Welte *et al.*, 2003). Die Daten stellen eine repräsentative Probe der Zellen dar, welche mit dem jeweiligen antigenspezifischen Antikörper (ungefülltes Histogramm; schwarz) oder der entsprechenden Isotyp-Kontrolle (gefülltes Histogramm; grau) gefärbt wurde.

Um die potenzielle Effektivität hinsichtlich eines adoptiven NK-Zelltransfers bestimmen zu können, wurden auch humane CIML-NK-Zellen in allen *in vitro* Zytotoxizitätsassays gegen BCP-ALL Zellen getestet (Ni *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2014). *In vitro* Zytotoxizitätsassays demonstrierten, dass NK-Zellen, welche an Tag -1 mit der BCP-ALL Zelllinie NALM-16 geprimed wurden, an Tag 7 der Kultur eine signifikant erhöhte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu ungeprimten Kontroll-NK-Zellen gegenüber den NALM-16 Zellen aufwiesen (siehe Abb. 6 A, B). Die mit einem Tumor geprimten NK-Zellen werden fortan als „Tumor-induzierte Memory-like (TIML)“ NK-Zellen bezeichnet. Die erhöhte zytotoxische Aktivität gegenüber den NALM-16 Leukämiezellen konnte auch bei den IL-12/IL-18-prä-aktivierten CIML-NK-Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 6 B). Auch nach einer längeren Kultur der NK-Zellansätze (21 Tage), blieb die verstärkte Zytotoxizität der TIML- und CIML-NK-Zellen gegenüber den NALM-16 Zellen im Vergleich zu ungeprimten Kontroll-NK-Zellen bestehen (siehe Abb. 6 C, D).

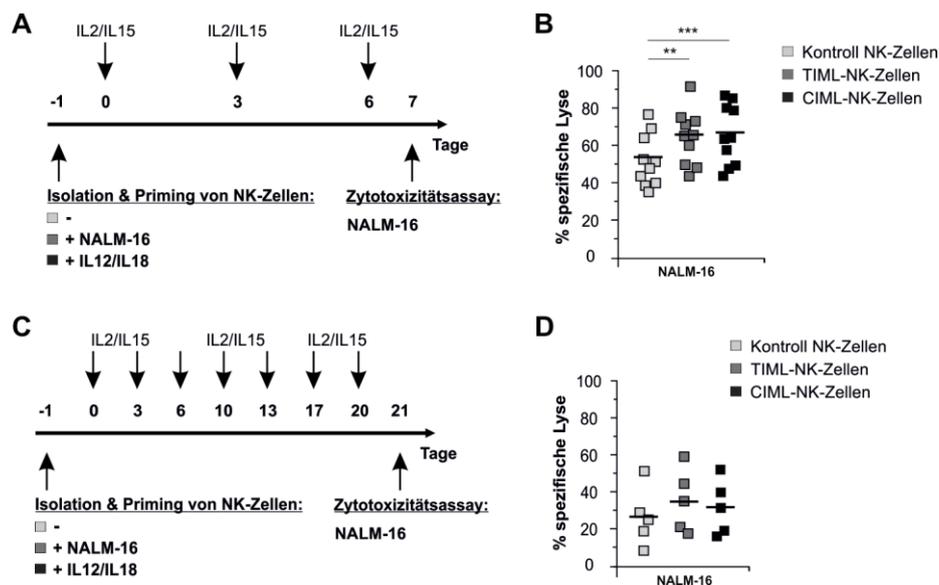


Abbildung 6: Ein Tumor-Priming mit der pädiatrischen BCP-ALL Zelllinie NALM-16 führt zu einer gesteigerten und langanhaltenden Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen. (A) Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NK-Zellen und des *in vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 7. **(B)** NALM-16-geprimte TIML-NK-Zellen zeigen an Tag 7 eine erhöhte Zytotoxizität in Form einer erhöhten spezifischen Lyse gegenüber den ursprünglich für das Priming verwendeten Tumorzellen NALM-16. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, NALM-16 als Targetzellen im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 10 verschiedene NK-Zell-Spender. **(C)** Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NK-Zellen und des Zytotoxizitätsassays an Tag 21. **(D)** NALM-16-geprimte TIML-NK-Zellen zeigen auch an Tag 21 eine erhöhte zytotoxische Aktivität gegenüber den NALM-16-Tumorzellen. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, NALM-16 als Targetzellen im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 5 verschiedene NK-Zell-Spender. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Weitere *in vitro* Zytotoxizitätsassays, in welchen frisch isolierte NK-Zellen mit den primären BCP-ALL Blasten der Patienten P3B und P31G geprimed wurden, belegten eine signifikant gesteigerte Zytotoxizität der TIML-, nicht aber der CIML-NK-Zellen im Vergleich zu ungeprimten Kontroll-NK-Zellen gegenüber den entsprechenden Patientenblasten an Tag 7 (siehe Abb. 7 A-C).

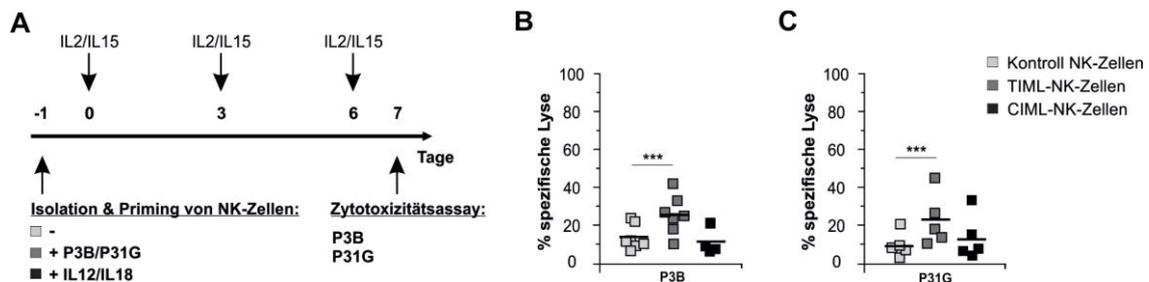


Abbildung 7: Ein Tumor-Priming mit primären BCP-ALL-Blasten führt zu einer erhöhten zytotoxischen Aktivität der TIML-NK-Zellen. (A) Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NK-Zellen und des *in vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 7. **(B)** P3B-geprimte TIML-NK-Zellen zeigen an Tag 7 eine erhöhte Zytotoxizität in Form einer erhöhten spezifischen Lyse gegenüber den P3B-Blasten. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, P3B als Targetzellen im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 7 verschiedene NK-Zell-Spender. **(C)** P31G-geprimte TIML-NK-Zellen zeigen an Tag 7 eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber den P31G-Blasten. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, P31G als Targetzellen im Verhältnis 9:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 5 verschiedene NK-Zell-Spender. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In klinischen Studien der Phase I/II wurden adoptive Transfers von NK-Zellen, welche mit sog. Feeder-Zellen expandiert wurden und adoptive Transfers der NK-Zell-Lymphom Zelllinie NK-92 in der Therapie von AML- oder CLL-Patienten untersucht (Tonn *et al.*, 2013; Fehniger *et al.*, 2014). Aus diesem Grund wurde analysiert, ob in den bereits zur Therapie eingesetzten expandierten NK-Zellsystemen und in der NK-Zelllinie NK-92 eine Konversion zu TIML-NK-Zellen nach einem Tumor-Priming möglich ist. Hierzu wurden mit IL-2 kultivierte NK-92 Zellen mit BCP-ALL NALM-16 Tumorzellen bzw. IL-12/IL-18 geprimed und an Tag 7 ein *in vitro* Zytotoxizitätsassay gegen NALM-16 durchgeführt (siehe Abb. 8 A). In mehreren Experimenten zeigten TIML-NK-92 Zellen eine erhöhte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu ungeprimten Kontroll-NK-92 Zellen gegenüber den NALM-16 Zellen (siehe Abb. 8 B). Bei den CIML-NK-92 Zellen blieb dieser Effekt hingegen aus. Auch K562-mbIL15-4-1BBL-expandierte NK-Zellen (NKAES; siehe Methoden 5.2.5) wurden an Tag 7 ihrer Expansion mit NALM-16 Zellen geprimed und an Tag 14 in einem *in vitro* Zytotoxizitätsassay gegen NALM-16 eingesetzt (siehe Abb. 8 C). TIML-NKAES zeigten an Tag 14 eine verstärkte spezifische Lyse gegenüber NALM-16 Zellen im Vergleich zu ungeprimten Kontroll-NKAES, CIML-NKAES sogar eine signifikant verstärkte Lyse (siehe Abb. 8 C, D).

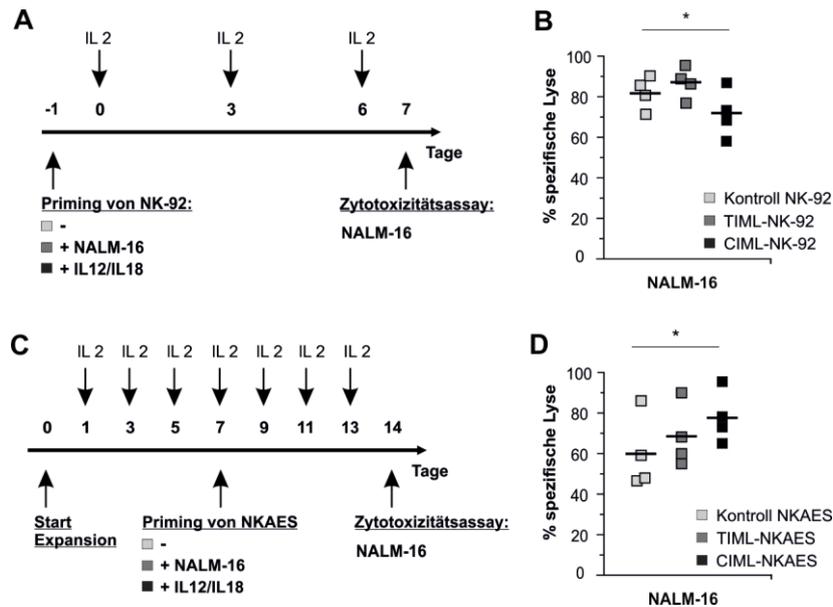


Abbildung 8: Ein Tumor-Priming mit der pädiatrischen BCP-ALL Zelllinie NALM-16 führt zu einer verstärkten Zytotoxizität von expandierten NK-Zellen sowie der NK-Zelllinie NK-92. (A) Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NK-92 und des *in vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 7. **(B)** NALM-16-geprimte TIML-NK-92 zeigen an Tag 7 eine erhöhte Zytotoxizität in Form einer erhöhten spezifischen Lyse gegenüber den Tumorzellen NALM-16. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-92 wurden als Effektor-, NALM-16 als Targetzellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 4 unabhängige Experimente. **(C)** Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NKAES und des *in vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 14. **(D)** NALM-16-geprimte TIML-NKAES zeigen an Tag 14 eine erhöhte Zytotoxizität gegenüber den Tumorzellen NALM-16. Kontroll-, TIML-, und CIML-NKAES wurden als Effektor-, NALM-16 als Targetzellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 4 verschiedene NK-Zell-Spender. * $p < 0.05$.

6.2 TIML-NK-Zellen reagieren Tumor-spezifisch

Anlässlich der Frage, in wie weit die gesteigerte zytotoxische Aktivität TIML-NK-Zellen auf einen Tumor oder auf eine bestimmte Tumorentität beschränkt ist, wurden *in vitro* Zytotoxizitätsassays durchgeführt, in welchen frisch isolierte NK-Zellen mit einem Tumor geprimed, aber an Tag 7 mit einem anderen Tumor restimuliert wurden (siehe Abb. 9 A, D). Die Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen Tumor-spezifisch auftritt, indem die TIML-NK-Zellen nur gegen den ursprünglich zum Priming verwendeten Tumor verstärkt reaktiv sind. So wird keine erhöhte Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen bei einem Priming mit der BCP-ALL NALM-16 und der Restimulation mit der AML KASUMI-1, und keine erhöhte Zytotoxizität bei einem Priming mit den primären BCP-ALL Blasten P31G und der Restimulation mit der BCP-ALL NALM-16 im Vergleich zu den jeweiligen ungeprimten Kontroll-NK-Zellen beobachtet (siehe Abb. 9 B, E). *In vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 7 mit autologen oder allogenen PBMCs als Targetzellen demonstrieren des Weiteren, dass TIML- und CIML-NK-Zellen areaktiv gegenüber gutartigen Zellen sind (siehe Abb. 9 C).

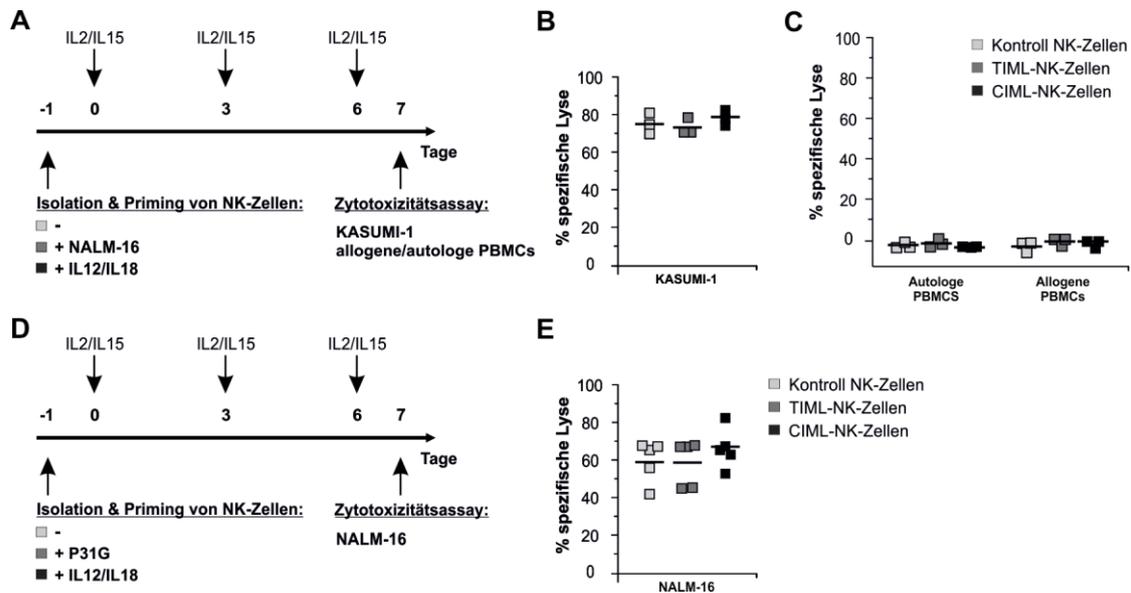


Abbildung 9: Ein Tumor-Priming führt zu einer Tumor-spezifischen zytotoxischen Aktivität der TIML-NK-Zellen. (A) Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NK-Zellen und des *in vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 7. (B) NALM-16-geprimte TIML-NK-Zellen zeigen an Tag 7 keine erhöhte Zytotoxizität gegenüber der nicht ursprünglich für das Priming verwendeten AML-Zelllinie KASUMI-1. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, KASUMI-1 als Targetzellen im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 3 verschiedene NK-Zell-Donoren. (C) Die NK-Zellansätze zeigen an Tag 7 keine Zytotoxizität gegenüber nicht-malignen autologen bzw. allogenen PBMCs. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, autologe bzw. allogene PBMCs als Targetzellen im Verhältnis 1:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 3 verschiedene NK-Zell-Donoren. (D) Experimentelles Layout der *in vitro*-Generierung von TIML- bzw. CIML-NK-Zellen und des *in vitro* Zytotoxizitätsassays an Tag 7. (E) P31G-geprimte TIML-NK-Zellen zeigen an Tag 7 keine erhöhte Zytotoxizität gegenüber der nicht ursprünglich für das Priming verwendeten BCP-ALL-Zelllinie NALM-16. Kontroll-, TIML-, und CIML-NK-Zellen wurden als Effektor-, NALM-16 als Targetzellen im Verhältnis 3:1 eingesetzt. Die Daten repräsentieren 5 verschiedene NK-Zell-Donoren.

6.3 Ein Priming mit allogenen PBMCs führt zu keiner erhöhten Zytotoxizität

Experimente, in denen frisch isolierte NK-Zellen mit allogenen PBMCs geprimed wurden, belegten keine verstärkte spezifische Lyse dieser PBMC-geprimten NK-Zellen gegenüber der BCP-ALL Zelllinie NALM-16 im Vergleich zu den jeweiligen ungeprimten Kontroll-NK-Zellen (siehe Abb. 10 A,B). Dies lässt den Schluss zu, dass die Induktion einer Gedächtnis-ähnlichen, Tumor-spezifischen NK-Zelle und der damit verbundenen verstärkten Funktionalität der TIML-NK-Zellen nur durch ein Priming mit malignen Tumorzellen möglich ist, nicht aber durch ein Priming mit gutartigen Zellen wie PBMCs (siehe Abb. 10 B).

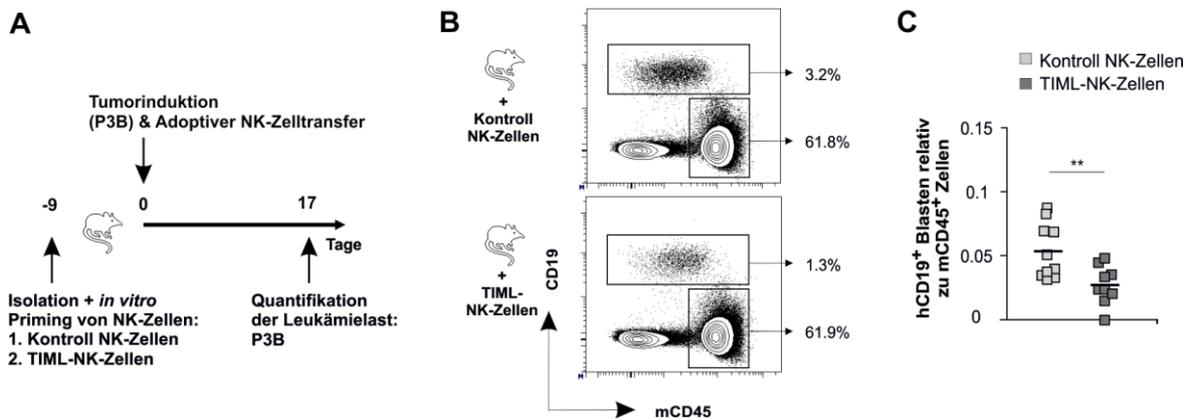


Abbildung 11: TIML-NK-Zellen zeigen einen anti-leukämischen Effekt gegenüber BCP-ALL-Blasten *in vivo*. (A) Experimentelles Layout für das *in vivo* Experiment. Die primären Patientenblasten P3B wurden an Tag 0 in unbestrahlte NSG-Mäuse injiziert, worauf ein adoptiver Transfer der *in vitro* generierten Kontroll- oder P3B-geprimten TIML-NK-Zellen folgte. An Tag 17 wurden die Versuchstiere euthanasiert, das Knochenmark präpariert und jenes durchflusszytometrisch auf definierte humane leukämische Oberflächenantigene hin analysiert. (B) Exemplarische Gating-Strategie zur Bestimmung der Leukämieast, welche sich aus dem Quotient von humanen (h)CD19⁺ Blasten und murinen (m)CD45⁺ Zellen ergibt. (C) Leukämieast der NSG-Mäuse, welche mit Kontroll-NK-Zellen (n=10 Mäuse) und TIML-NK-Zellen (n=9 Mäuse) aus 3 verschiedenen NK-Zell-Spendern injiziert wurden. ** $p < 0.01$.

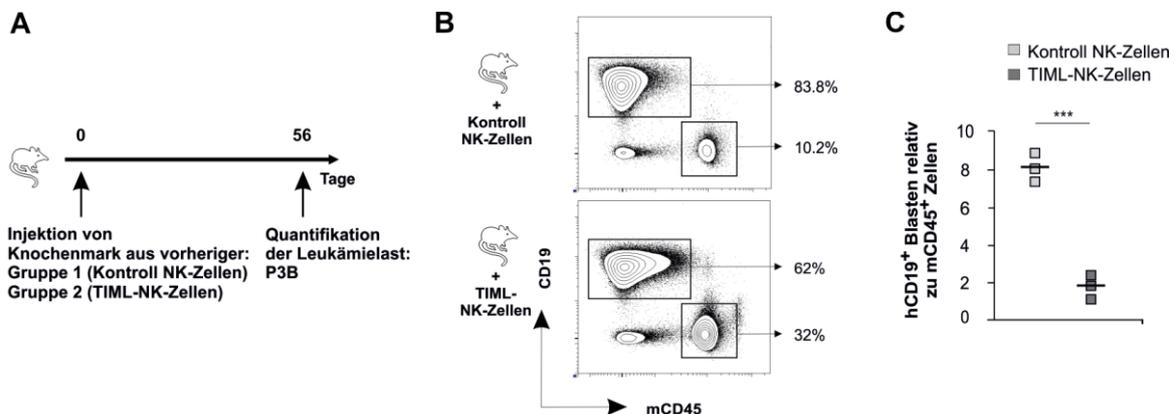
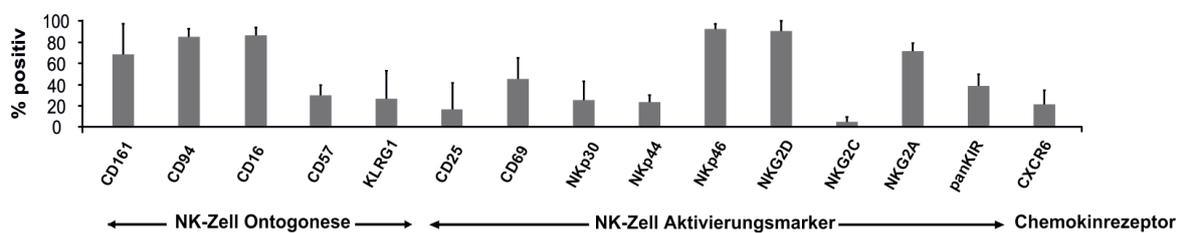


Abbildung 12: Retransplantationsexperimente bestätigen die anti-leukämische Aktivität der TIML-NK-Zellen. (A) Experimentelles Layout für das *in vivo* Retransplantationsexperiment. Knochenmarkszellen aus den Präparationen des adoptiven NK-Zelltransfers der jeweiligen Gruppen eines NK-Zell-Spenders wurden vereinigt und an Tag 0 in unbestrahlte NSG-Mäuse injiziert. An Tag 58 wurden die Versuchstiere euthanasiert, das Knochenmark präpariert und jenes durchflusszytometrisch auf definierte humane leukämische Oberflächenantigene hin analysiert. (B) Exemplarische Gating-Strategie zur Bestimmung der Leukämieast, welche sich aus dem Quotient von humanen (h)CD19⁺ Blasten und murinen (m)CD45⁺ Zellen ergibt. (C) Leukämieast der NSG-Mäuse, welche mit Knochenmarkszellen der vorherigen Kontroll-NK-Zellgruppe (n=3 Mäuse) und TIML-NK-Zellgruppe (n=3 Mäuse) injiziert wurden. *** $p < 0.001$.

6.5 TIML-NK-Zellen weisen einen reifen Phänotypen auf

Eine Analyse der Oberflächenrezeptoren ergab einen $CD56^{br} CD94^{hi} NKG2A^{hi} CD16^{hi} CD57^{int} KLRG1^{int} inhKIR^{int}$ Phänotypen der TIML-NK-Zellen an Tag 7 (siehe Abb. 13). Dieser Phänotyp stellt eine Zwischenstufe zwischen den weniger reifen $CD94^{hi} NKG2A^{hi} CD57^{-} inhKIR^{-}$ NK-Zellen und der reifsten Stufe $CD94^{-} NKG2A^{-} CD57^{+} inhKIR^{+}$ der NK-Zellentwicklung dar (Miller und McCullar, 2001; Bjorkstrom *et al.*, 2010; J. Yu *et al.*, 2010).



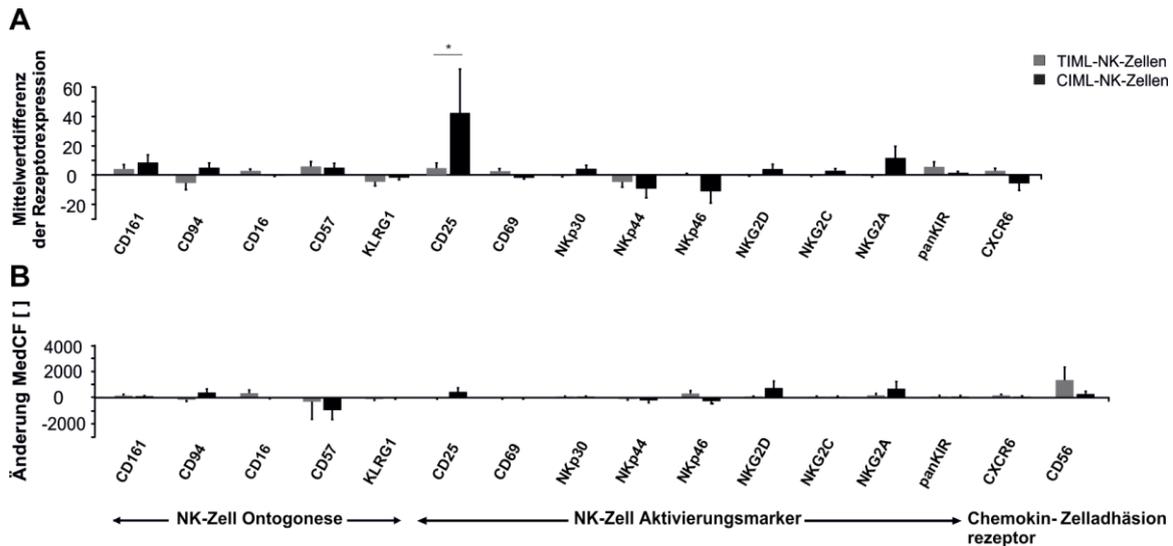


Abbildung 14: TIML-NK-Zellen unterscheiden sich phänotypisch kaum von Kontroll-NK-Zellen. Phänotypische Charakterisierung von Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zellen an Tag 7. **(A)** NK-Zellpopulationen, welche die obenstehenden Rezeptoren exprimieren, wurden durchflusszytometrisch quantifiziert. Dargestellt sind die Mittelwertdifferenzen als $CD56^+CD3^+$ Rezeptor⁺ Populationen der TIML- und CIML-NK-Zellen bezüglich der Kontroll-NK-Zellen. **(B)** Die mediane Fluoreszenzintensität (MedCF) der $CD56^+CD3^+$ Rezeptor⁺ Populationen wurde durchflusszytometrisch quantifiziert und die Mittelwertdifferenzen der TIML- und CIML-NK-Zellen bezüglich der Kontroll-NK-Zellen als „Änderung MedCF“ angegeben. Die Ergebnisse aus **(A, B)** repräsentieren 12 verschiedene NK-Zell-Spender. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider. * $p < 0.05$.

6.6 Die differentielle Genexpression der TIML-NK-Zellen

In einer Transkriptomanalyse der TIML- und CIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen sollten eventuelle Unterschiede in der Genexpression identifiziert werden, die zu einer Konversion der TIML-NK-Zellen beitragen könnten. Hierzu wurde an Tag 7 die totale RNA aus den NK-Zellansätzen von vier NK-Zell-Spendern isoliert und diese auf den Array hybridisiert. Die Ergebnisse der Transkriptomanalyse sind anhand einer Heatmap, in welcher die 50 variabelsten Gene innerhalb der 4 NK-Zell-Spender und der NK-Zellansätze unter Verwendung der euklidischen Distanz geclustert wurden, dargestellt (siehe Abb. 15). Aus der Heatmap wird deutlich, dass zwischen den einzelnen Spendern (Donor 1-4) signifikante interindividuelle Variabilitäten bezüglich der Genexpression bestehen, wobei diese Variabilitäten auch zwischen den einzelnen NK-Zellansätzen zu erkennen sind (siehe Abb. 15). Das hierarchische Clustering der NK-Zellansätze ergab bei drei (Spender 1, 3 und 4) der vier Spender eine ähnlichere Genexpression zwischen CIML- und Kontroll-NK-Zellen als zwischen TIML- und Kontroll-NK-Zellen (siehe Abb. 15).

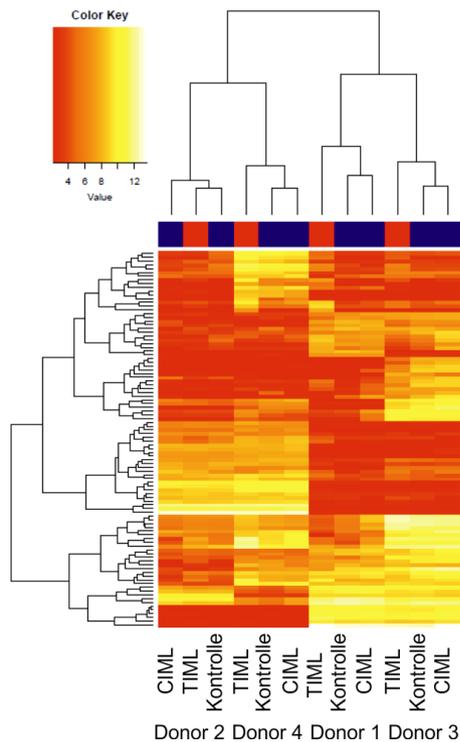


Abbildung 15: Heatmap der Genexpression von TIML- und CIML- im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen. Heatmap und hierarchisches Clustering der Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zellansätze 4 verschiedener Spender an Tag 7. Die 50 variabelsten Gene innerhalb der 4 Spender und der NK-Zellansätze wurden unter Verwendung der euklidischen Distanz geclustert. Hochregulierte Gene sind gelb, niederregulierte Gene rot markiert. Die Daten zeigen 4 NK-Zell-Spender (Donor 1-4).

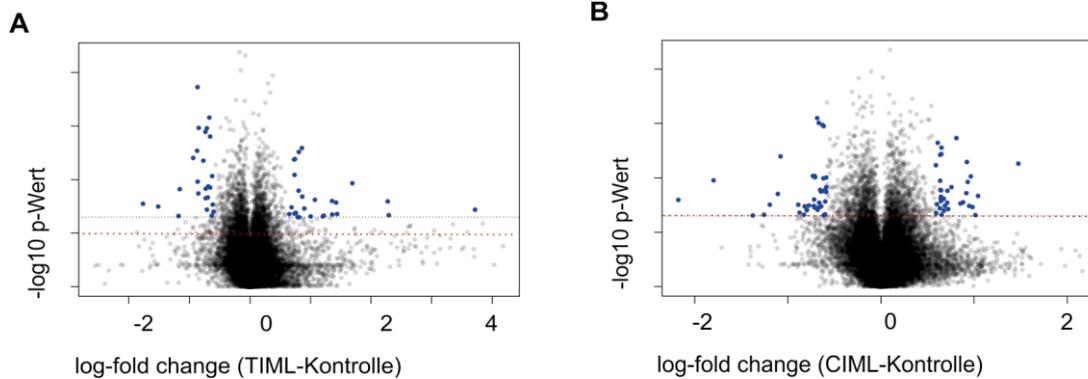


Abbildung 16: Die differentielle Genexpression der TIML- und CIML-NK-Zellen. Vulcano-Plot der Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zellansätze an Tag 7. Gezeigt ist die logarithmierte (log) Änderung (Fold change; X-Achse) aufgetragen gegen den logarithmierten p-Wert (Y-Achse) von **(A)** TIML-/Kontroll-NK-Zellen und **(B)** CIML-/Kontroll-NK-Zellen. Die Gene mit einer signifikanten Änderung (\log Fold change > 0.5 bzw. < -0.5) sind blau markiert und im Anhang aufgeführt. Die rote Linie deutet den signifikanten Schwellenwert $p=0.05$ an. Die Daten zeigen 4 NK-Zell-Spender.

Die Analyse des Transkriptom der TIML- und CIML-NK-Zellen mit Hilfe eines Vulcano-Plots, in welchem die logarithmierte Änderung (Fold change; X-Achse) der Genexpression gegen dessen logarithmierten p-Wert (Y-Achse) aufgetragen ist, identifizierte des Weiteren signifikant hoch- und niederregulierte Gene in den beiden NK-Zellansätzen (siehe Abb. 16).

In den TIML-NK Zellen sind im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen z.B. die Transkripte der Gene *IL-26*, *ALDOC*, *HDAC9*, *CCR2*, *CXCR6*, *IRAK3* und *IL17RA* signifikant hochreguliert, während die Transkripte der Gene *DUSP4*, *AGMAT*, *VDR* und *PDGFA* signifikant herunterreguliert sind. In den CIML-NK Zellen sind im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen die Transkripte der Gene *IL1R1*, *CCR7*, *IL18RAP*, *IFRD1* und *HLA-DRA* signifikant hochreguliert, wohingegen die Transkripte der Gene *IGF2BP2*, *KIR2DL4*, *NCR2* und *ALDH6A1* signifikant herunterreguliert sind. Eine ausführliche Auflistung der Gene inklusive der p-Werte findet sich im Anhang in Tab. 21-24. Zur Validierung der Transkriptomergebnisse wurde eine quantitative RT-PCR der NK-Zellansätze mittels definierter Primer für die Gene *CXCR6*, *HDAC9*, *IFNG*, *IL17RA*, *IRF5*, *KIR2DL4*, *NCR2*, *PDGFA* und *TNFSF9* durchgeführt. Hierzu wurde RNA aus denselben RNA-Präparationen der vier NK-Zell-Spender wie in der Transkriptomanalyse verwendet. Die relativen Änderungen der Expressionslevel der einzelnen Gene zwischen den jeweiligen NK-Zellansätzen entsprechen den Transkriptomdaten (siehe Abb. 17).

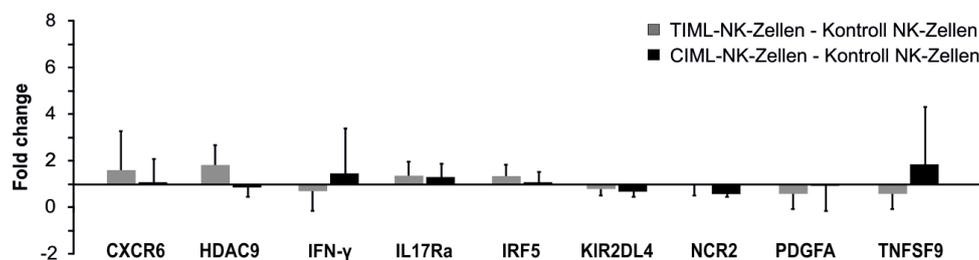


Abbildung 17: Verifikation der Transkriptomanalyse der TIML-NK-Zellen via q-RT-PCR. Die Genexpression von *CXCR6*, *HDAC9*, *IFNG*, *IL17RA*, *IRF5*, *KIR2DL4*, *NCR2*, *PDGFA* und *TNFSF9* in Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zellen an Tag 7 wurde mittels einer quantitativen RT-PCR bestimmt. Die relative Änderung der Expressionslevel der einzelnen Gene wird als „fold change“ zwischen den jeweiligen NK-Zellansätzen angegeben. *ACTB*, *PDHB* und *SDHA* wurden als Referenzgene für die Normalisierung der Expressionsdaten genutzt. Die Fehlerrechnung erfolgte mittels einer Fehlerfortpflanzung. Die Daten repräsentieren 4 NK-Zell-Spender.

Im nächsten Schritt wurden die Genexpressionsdaten der TIML- und CIML-NK-Zellen auf ihre genontologischen Zusammenhänge hin untersucht. Die ontologischen Analysen belegen eine signifikant erhöhte Anzahl an regulierten Genen in den TIML-NK-Zellen, welche in sog. genontologischen Überbegriffen (GO-Terms) zusammengefasst sind.

Während sowohl TIML- als auch CIML-NK-Zellen eine signifikant erhöhte Anzahl an regulierten Genen im Bereich der zellulären Komponenten zeigen, vor allem im GO-Term „Membrane part“, zu dem Gene wie *CXCR6*, *IL17RA*, *CCR7* oder *IL18RAP* zählen, zeigen nur TIML-NK-Zellen eine signifikant erhöhte Anzahl an regulierten Genen in GO-Terms, welche in metabolischen Prozessen involviert sind und unter welchen z.B. die Gene *CYP11B1*, *ALDOC*, *TKTL1*, *AGMAT* und *VDR* zusammengefasst werden (siehe Abb. 18).

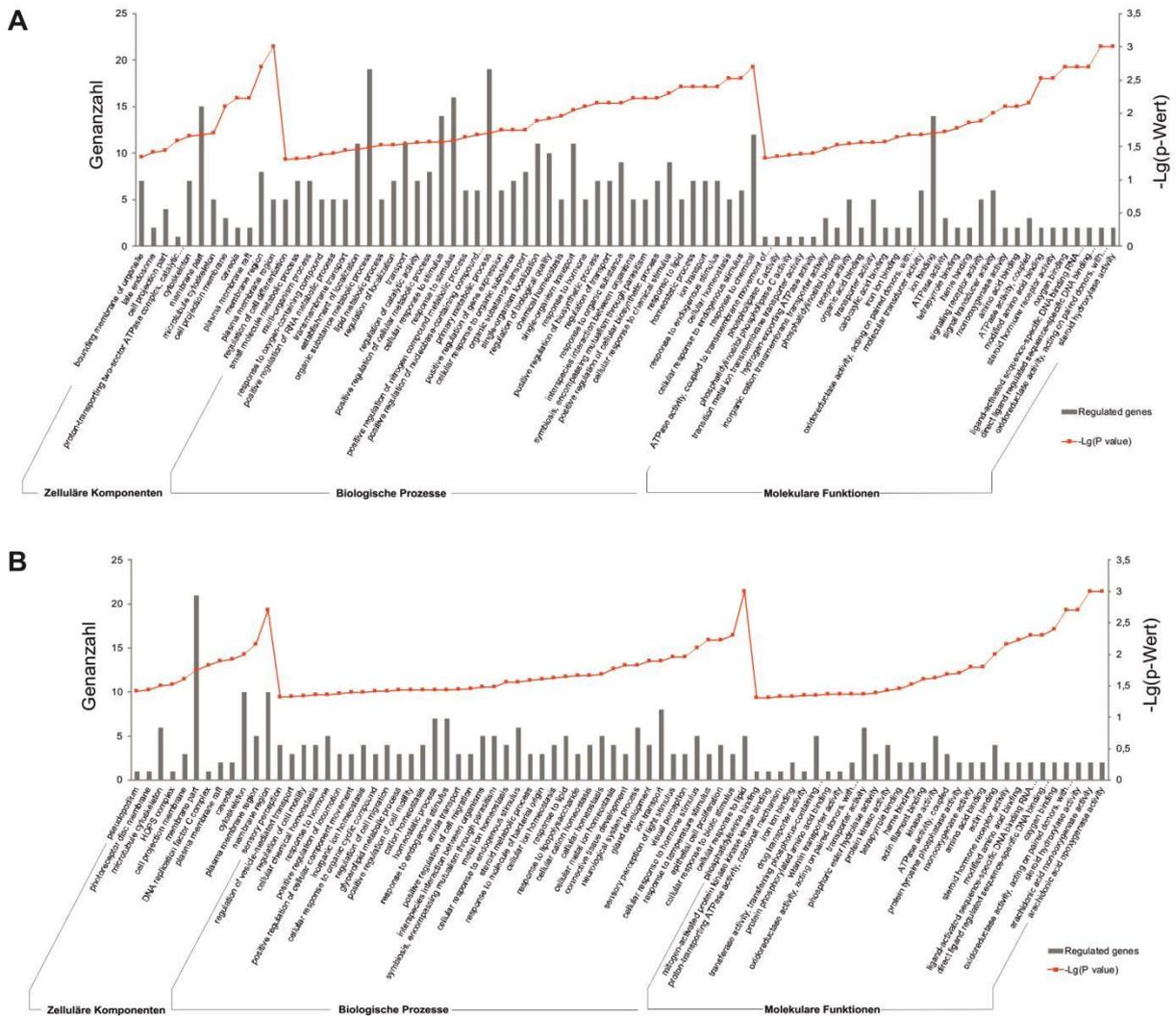


Abbildung 18: Die verschiedenartige Genexpression der TIML- und CIML-NK-Zellen und deren genontologische Zusammenhänge. Ontologische Analyse der Genexpression von Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zellansätze an Tag 7. Gezeigt ist die Anzahl der regulierten Gene (grau; linke Y-Achse) und deren Signifikanz in Form des negativen logarithmierten (lg) p-Werts (rot; rechte Y-Achse) von (A) TIML-/Kontroll-NK-Zellen und (B) CIML-/Kontroll-NK-Zellen. Auf der X-Achse sind die genontologischen Überbegriffe (GO-Terms), in welchen die regulierten Gene zusammengefasst werden, dargestellt. Angegeben sind die GO-Terms mit der größten Anzahl an regulierten Genen aus den Bereichen: Zelluläre Komponenten (12), biologische Prozesse (40) und molekulare Funktionen (30). Die Daten repräsentieren 4 NK-Zell-Spender.

6.7 Untersuchungen zur Proliferation und Vitalität der TIML-NK-Zellen

Um die Homöostase der TIML-NK-Zellen verstehen zu können, wurden weiterführend Zellzyklusanalysen und Viabilitätsassays durchgeführt, sowie die Zellfrequenzen der NK-Zellansätze im Verlauf der Kultur bestimmt. Die Zellzyklusanalysen an den Tagen 0, 3 und 7 der Kultur demonstrierten anhand einer signifikant erhöhten BrdU⁺7-AAD⁺ Population einen frühen Eintritt der TIML-NK-Zellen (an Tag 0 nach dem Tumor-Priming) in die S-Phase, in welcher zur Vorbereitung für die Zellteilung die DNA-Replikation stattfindet (siehe Abb. 19 C). Im Gegensatz hierzu treten die CIML-NK-Zellen erst verspätet an Tag 3 in die S-Phase ein (siehe Abb. 19 C). Der Anteil an NK-Zellen, welche positiv für die S-Phase sind, sinkt bei den TIML-NK-Zellen bis Tag 7 wieder auf das Niveau der Kontroll-NK-Zellen, während die Frequenz der S-Phase⁺ CIML-NK-Zellen an Tag 7 noch leicht erhöht ist (siehe Abb. 19 C).

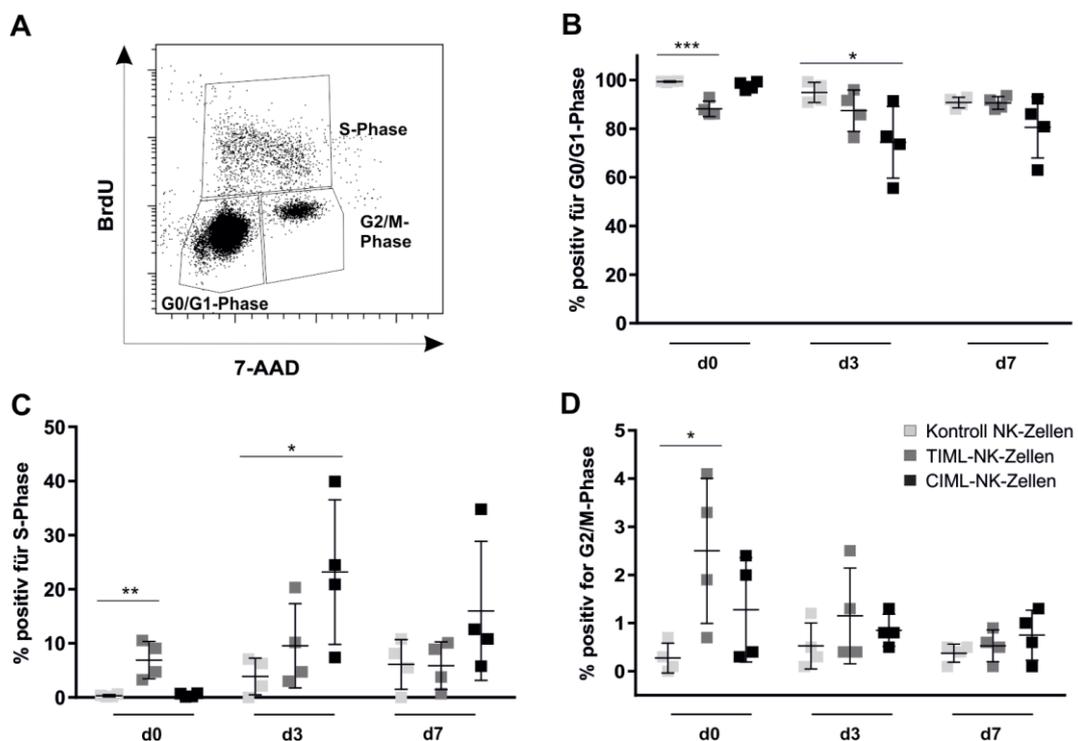


Abbildung 19: Ein Tumor-Priming fördert den frühen Eintritt der TIML-NK-Zellen in die S- und G2/M-Zellzyklusphase. Zellzyklusanalyse von Kontroll-, NALM-16-geprimten TIML- und CIML-NK-Zellen an den Tagen 0, 3 und 7. (A) Exemplarische Gating-Strategie zur Bestimmung der vorliegenden Zellzyklusphase. Zellen positiv für die G0/G1-Phase werden als BrdU⁺7-AAD⁻, für die S-Phase als BrdU⁺7-AAD⁺ und für die G2/M-Phase als BrdU⁺7-AAD⁺ definiert. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse stellen den Mittelwert der für die (B) G0/G1-, (C) S-, und (D) G2/M-Zellzyklusphase positiven CD56⁺CD3⁻ Populationen der einzelnen NK-Zellansätze von 4 verschiedenen NK-Zell-Spendern dar. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

BrdU⁷-AAD⁺ Zellen repräsentieren Zellen in der G₂/M-Phase, welche postsynthetisch bzw. prämitotisch sind oder sich in der Mitose befinden. Die Frequenz der G₂/M⁺ TIML-NK-Zellen ist an Tag 0 signifikant erhöht und nähert sich bis Tag 7 wieder der Frequenz der Kontroll-NK-Zellen an (siehe Abb. 19 D). Folglich ist die BrdU⁷-AAD⁻ Population, welche die G₀/G₁-Phase wiedergibt und in welcher sich postmitotische bzw. präsynthetische oder auch ruhende Zellen befinden, bei den TIML-NK-Zellen an Tag 0 signifikant erniedrigt, wohingegen dies bei den CIML-NK-Zellen erst an Tag 3 der Fall ist (siehe Abb. 19 B). Der Anteil an G₀/G₁-Phase⁺ NK-Zellen steigt bei den TIML-NK-Zellen bis Tag 7 wieder auf das Niveau der Kontroll-NK-Zellen, während die Frequenz der CIML-NK-Zellen an Tag 7 noch leicht erniedrigt ist (siehe Abb. 19 B).

In weiteren Experimenten wurde die Viabilität der TIML- und CIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen durchflusszytometrisch mittels einer 7-AAD- und Annexin V-Färbung an den Tagen 0, 3 und 7 untersucht. TIML-NK-Zellen zeigen an Tag 0, also einem Tag nach dem Tumor-Priming, eine erhöhte Anzahl an 7-AAD⁻ Annexin V⁺ Zellen, welche als früh-apoptotisch klassifiziert werden. Auch die Frequenz der spät-apoptotischen Zellen ist bei den TIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll- und CIML-NK-Zellen an Tag 0 erhöht, während die Frequenz der vitalen Zellen am niedrigsten ist (siehe Abb. 20 B, C).

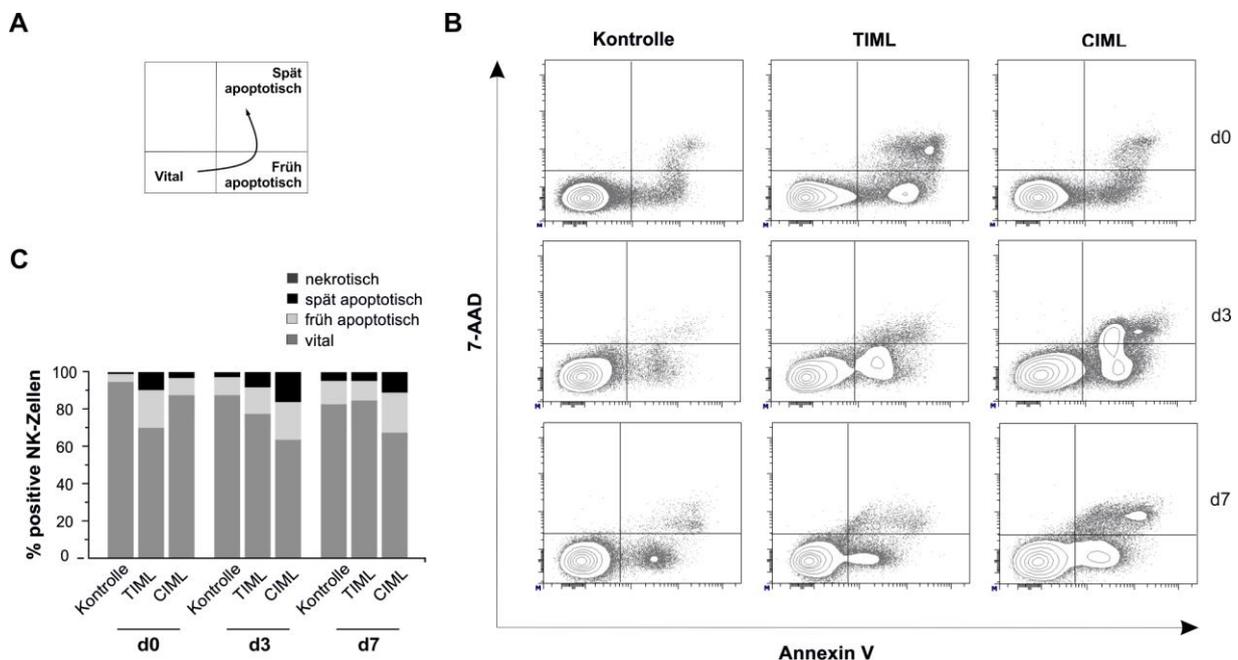


Abbildung 20: Ein Tumor-Priming begünstigt die Vitalität der TIML-NK-Zellen. Viabilitätsassay von Kontroll-, NALM-16-geprimten TIML- und CIML-NK-Zellen an den Tagen 0, 3 und 7. **(A, B)** Exemplarische Gating-Strategie. 7-AAD⁻AnnexinV⁻ Zellen werden als vital, 7-AAD⁻ Annexin V⁺ als früh apoptotisch, 7-AAD⁺AnnexinV⁺ als spät apoptotisch und 7-AAD⁺AnnexinV⁻ als nekrotisch definiert. **(C)** Die Ergebnisse des Viabilitätsassays geben den Mittelwert der vitalen, früh apoptotischen, spät apoptotischen sowie nekrotischen CD56⁺CD3⁻ Populationen der einzelnen NK-Zellansätze von 4 verschiedenen NK-Zell-Spendern an.

Während sich der Anteil der vitalen Zellen bei den TIML-NK-Zellen über Tag 3 bis hin zu Tag 7 erholt und dementsprechend der Anteil an früh und spät apoptotischen Zellen sinkt, nimmt die Frequenz an früh und spät apoptotischen Zellen bei den CIML- im Vergleich zu den Kontroll- und TIML-NK-Zellen an Tag 3 und Tag 7 stark zu (siehe Abb. 20 B, C).

Aufgrund der Tatsache, dass ein Tumor-Priming zum einen den frühen Eintritt der TIML-NK-Zellen in die S- und G2/M-Zellzyklusphase fördert, und zum anderen die Vitalität der TIML-NK-Zellen an Tag 7 im Vergleich zu den CIML-NK-Zellen begünstigt, wurden abschließend die Zellzahlen der NK-Zellansätze im Verlauf der Kultur bestimmt (siehe Abb. 21). Hierzu wurden Aliquots der NK-Zellansätze an den Tagen 3 und 6 mit einer Trypanblau-Lösung versetzt und ungefärbten lebenden Zellen in einer Zählkammer gezählt. Die Daten belegen einen Anstieg der Zellzahlmittelwerte der TIML-NK-Zellen an Tag 3 um das 1,5-fache ($\pm 0,4$) und Tag 6 um das 1,3-fache ($\pm 0,5$) im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen (siehe Abb. 21). Bei den CIML-NK-Zellen änderte sich die Zellzahl gegenüber den Kontroll-NK-Zellen an Tag 3 mit den Werten 1,01-fach $\pm 0,2$ nicht (siehe Abb. 21). Erst an Tag 6 zeigten auch die CIML-NK-Zellen einen leichten Anstieg der Zellzahl um das 1,2-fache gegenüber den Kontroll-NK-Zellen ($\pm 0,5$).

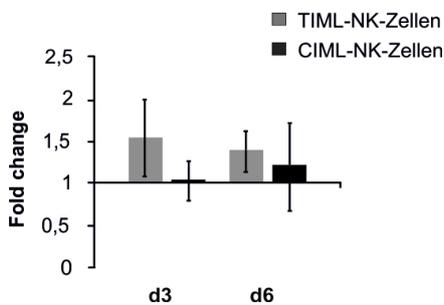


Abbildung 21: Ein Tumor-Priming erhöht die Frequenz der TIML-NK-Zellen. Zellzahlen von Kontroll-, NALM-16-geprimten TIML- und CIML-NK-Zellen an den Tagen 3 und 6. Angegeben ist der Mittelwert der Änderung (Fold change) der Zellzahlen von CD56⁺CD3⁻ TIML- und CIML-NK-Zellen gegenüber den Kontroll-NK-Zellen. Die Daten repräsentieren 10 NK-Zell-Spender an Tag 3 und 17 an Tag 6. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an.

6.8 Die funktionelle NK-Zellantwort der TIML-NK-Zellen nach Tumor-Restimulation

In vorherigen Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Tumor-Priming die Induktion von Tumor-induzierten Memory-like NK-Zellen bewirkt, welche eine stärkere und Tumor-spezifische Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* aufweisen. Weiterführend wurden Kontroll-, TIML- und CIML-NK-Zellen an Tag 7 in intrazellulären Färbungen untersucht, um die funktionelle NK-Zellantwort nach Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen bezüglich der Synthese des Zytokins IFN- γ , der Sekretion des lytischen Proteins Perforin und der Degranulation der NK-Zellen selbst (CD107a) zu bestimmen.

Das von NK-Zellen produzierte Zytokin IFN- γ besitzt eine starke antitumorale Wirkung. Perforin, welches in der immunologischen Synapse exozytiert wird, verursacht Löcher in den Zellmembranen der Tumorzellen und zerstört dadurch deren Zellintegrität. So können Granzyme eindringen, welche dann die Apoptose in den Targetzellen induzieren. Die Degranulation der NK-Zellen, welche die Exozytose der lysosomalen Granula beschreibt, kann über CD107a, dem lysosomalen Membranglykoprotein-1 (LAMP-1), nachgewiesen werden. CD107a ist zusammen mit Perforin in den sekretorischen Lysosomen kolokalisiert. LAMP-1 wird bei der Fusion der Granula mit der Zellmembran an die Zelloberfläche transportiert und danach wieder internalisiert. Über eine CD107a-Oberflächenfärbung wird so die Degranulation der zytotoxischen NK-Zellen nach einer Stimulation mit Tumorzellen bestimmt.

Hierzu wurde den Kontroll-, TIML- und CIML-NK-Zellansätzen an Tag 7 der CD107a-Antikörper hinzugegeben und diese nach einer Ko-Kultur von 6 h mit NALM-16 Tumorzellen gegen intrazelluläres Perforin und IFN- γ mit Hilfe des Fix&Perm[®] Permeabilisierungskits gefärbt. Erste Analysen anhand mehrerer NK-Zell-Spender zeigten, dass die Frequenz der Zellen, welche positiv für Perforin sind, in dem TIML-NK-Zellansatz im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen nach einer 6-stündigen Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen an Tag 7 signifikant verstärkt ist (siehe Abb. 22). Im Gegensatz hierzu ist bei den CIML-NK-Zellen keine signifikante Erhöhung zu beobachten (siehe Abb. 22).

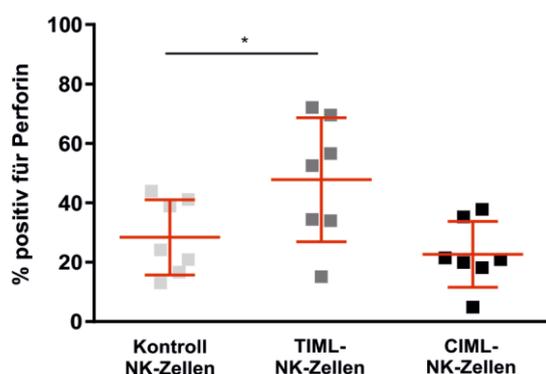


Abbildung 22: Ein Tumor-Priming induziert nach Restimulation eine höhere Frequenz an Perforin⁺ TIML-NK-Zellen. Intrazelluläre Perforin-Färbung von Kontroll-, NALM-16-geprimten TIML- und CIML-NK-Zellen an Tag 7, um die funktionelle NK-Zellantwort nach Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen zu analysieren. Angegeben ist der Mittelwert der Frequenz an Perforin⁺ NK-Zellen der verschiedenen NK-Zellansätze nach Restimulation. Die Daten repräsentieren 7 NK-Zell-Spender. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. * $p < 0.05$.

In weiteren Untersuchungen wurde die kombinierte funktionelle NK-Zellantwort nach einer 6-stündigen Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen an Tag 7 mit Hilfe einer SPICE-Analyse und einer Boolean-Gatingstrategie bestimmt (siehe Abb. 23 A, B). Die Ergebnisse belegen eine erhöhte Frequenz einer zweifachen NK-Zellantwort der TIML-NK-Zellen (32,1 %) im Vergleich zu den Kontroll- (26,3 %) und CIML-NK-Zellen (13,4 %) nach einer 6-stündigen Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen an Tag 7 (siehe Abb. 23 A, B).

Auch die einfache NK-Zellantwort in Form einfach positiver NK-Zellen für Perforin bzw. CD107a oder IFN- γ nach einer 6-stündigen Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen ist in TIML-NK-Zellen (48,2 %) im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen (44,1 %) gesteigert (siehe Abb. 23 A, B). Der Anteil an NK-Zellen, welche an Tag 7 nach einer Restimulation mit NALM-16 Zellen weder für das lytische Protein Perforin, noch für das Membranglykoprotein-1 CD107a oder das Zytokin IFN- γ positiv sind und demnach keine NK-Zellantwort zeigen, ist bei den TIML-NK-Zellen mit 17,3 % am geringsten (siehe Abb. 23 A, B). Hingegen ist dieser Anteil an NK-Zellen, bei welchen nach Restimulation keine funktionelle Antwort zu beobachten ist, bei den CIML-NK-Zellen mit 38,4 % am höchsten, gefolgt von den Kontroll-NK-Zellen mit 27,1 % (siehe Abb. 23 A, B). Interessanterweise unterscheidet sich jedoch die Frequenz von dreifachpositiven Perforin⁺CD107a⁺IFN- γ ⁺ NK-Zellen in allen drei NK-Zellansätzen kaum: Kontroll-NK-Zellen 2,2 %, TIML-NK-Zellen 2,3 % und CIML-NK-Zellen 1,6 % (siehe Abb. 23 A, B). Zudem gilt anzumerken, dass die Anzahl IFN- γ ⁺ NK-Zellen in keinem der NK-Zellansätze nach Restimulation mit NALM-16 Zellen deutlich erhöht vorliegt, auch nicht in den als solchen beschriebenen IL-12/IL-18-präaktivierten CIML-NK-Zellen (siehe Abb. 23 A, B) (Ni *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2012).

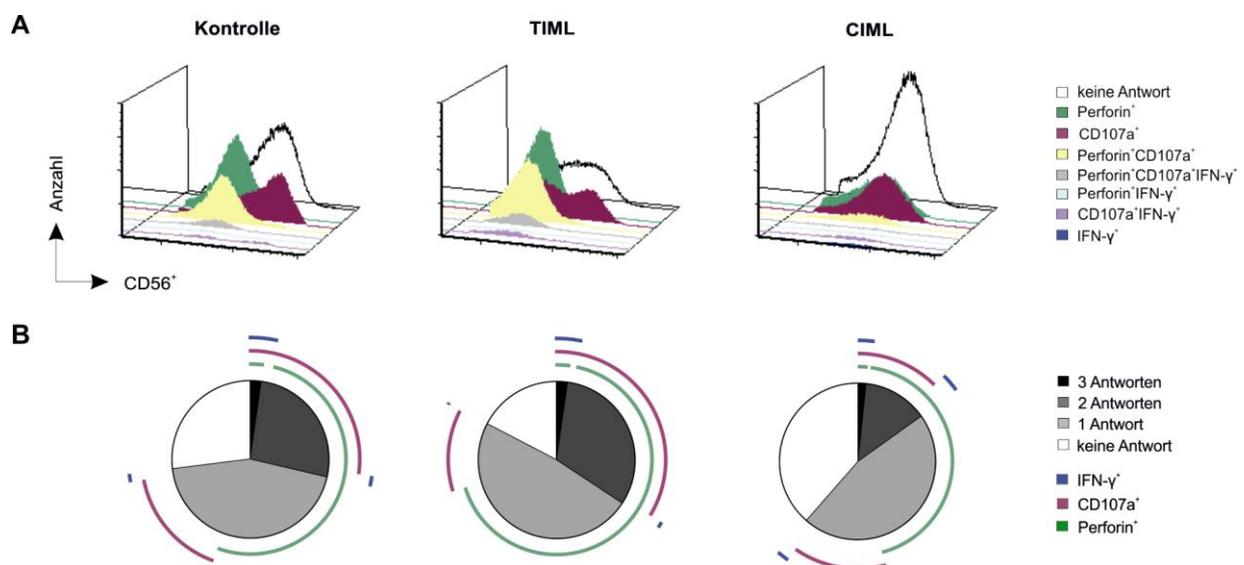


Abbildung 23: TIML-NK-Zellen weisen eine verstärkte funktionelle NK-Zellantwort nach Restimulation auf. Intrazelluläre Färbung und SPICE-Analyse von Kontroll-, NALM-16-geprimten TIML- und CIML-NK-Zellen an Tag 7, um die funktionelle NK-Zellantwort nach Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen bezüglich der IFN- γ -Synthese, der Sekretion von Perforin und der Degranulation (CD107a) anhand einer Boolean-Gatingstrategie zu bestimmen. **(A)** Original-Überlagerungen von Histogrammen eines NK-Zell-Spenders der CD56⁺CD3⁻ NK-Zellansätze, welche die Frequenz der verschiedenen NK-Zellantworten wiedergeben. **(B)** Die Kreissegmente geben die Frequenz der Zellen an, welche positiv für eine bestimmte Zahl an Antworten sind. Die Kreisbögen zeigen die relative Frequenz derjenigen Zellen, die entweder positiv für IFN- γ (dunkelblau), Perforin (grün) oder CD107a (magenta) sind. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von 3 NK-Zell-Spendern aus 3 unabhängigen Experimenten.

6.9 Die immunologische Synapse der TIML-NK-Zellen

In Untersuchungen zur funktionellen NK-Zellantwort der TIML-NK-Zellen nach einer Restimulation mit NALM-16 Zellen an Tag 7 konnte gezeigt werden, dass die Frequenz der einfach Perforin⁺ NK-Zellen sowie die Frequenz einer zweifachen NK-Zellantwort bestehend aus Perforin und CD107a der TIML-NK-Zellen im Vergleich zur Kontrolle stark erhöht ist. Konfokale Aufnahmen zur Restimulation und Konjugatbildung zwischen den NK-Zellansätzen und den NALM-16 Tumorzellen an Tag 7 sollten nun klären, ob und inwiefern die Bildung der immunologischen Synapse (IS), in welcher die lytischen Granula exozytiert werden, bei den TIML-NK-Zellen verändert ist (siehe Abb. 24).

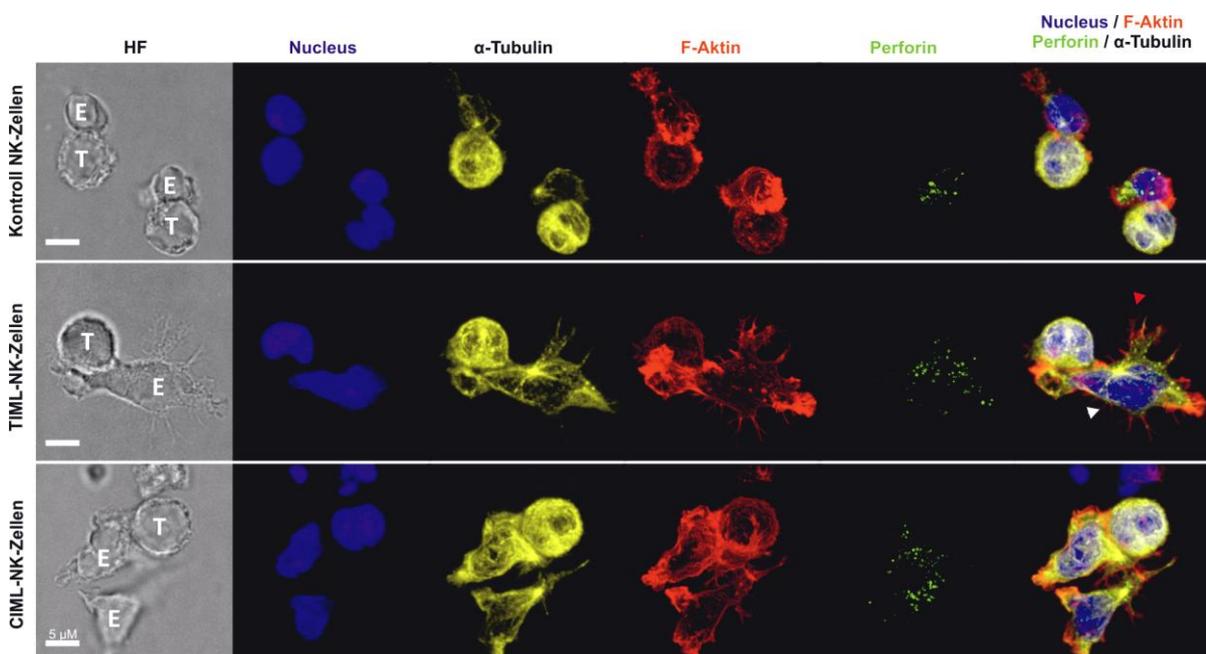


Abbildung 24: TIML-NK-Zellen zeigen während der Konjugatbildung mit NALM-16 Tumorzellen eine gesteigerte Perforin-Sekretion und eine veränderte Zellform. Konfokale Aufnahmen von Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zell/NALM-16-Konjugaten eines repräsentativen NK-Zell-Spenders an Tag 7 nach der Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen. Der Nucleus (blau) wurde mittels des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI, das Zytoskelett bzw. F-Aktin mit AF568-konjugiertem Phalloidin (rot) dargestellt. Die Markierung von α -Tubulin (gelb) erfolgte über einen AF647-konjugierten Antikörper, die von Perforin (grün) über einen AF488-konjugierten Antikörper. Bis auf die Hellfeldaufnahme, welche ein einzelnes Bild darstellt, sind alle Fluoreszenzaufnahmen Z-Stapel mit einer Schichtdicke von 1 μ m. HF, Hellfeld; E, Effektorzelle; T, Targetzelle. Die weiße Pfeilspitze weist auf die abgeflachte Zellform und die rote Pfeilspitze auf die F-Aktinreichen Zellfortsätze der TIML-NK-Zellen hin. Der Maßstab entspricht 5 μ m.

Hierzu wurden NK-Zellen der verschiedenen NK-Zellansätze mit NALM-16-Zellen inkubiert und die gebildeten NK-Zell/NALM-16-Konjugate auf Silan-beschichtete Objektträger transferiert, fixiert, permeabilisiert, gefärbt und abschließend eingedeckelt.

So konnten mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie der DNA-beinhaltende Nucleus, das F-aktinreiche Zytoskelett, das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) sowie die lytischen Perforin-Granula während der Konjugatbildung zwischen NK- und Tumorzellen dargestellt werden (siehe Abb. 24). Die konfokalen Aufnahmen zeigen anhand der F-Aktin Markierung des Zytoskeletts, dass die gesamte Zellform der TIML-NK-Zellen während der Konjugatbildung mit NALM-16 Zellen abgeflacht und somit die Zelloberfläche vergrößert erscheint (siehe Abb. 24; weiße Pfeilspitze), wohingegen die Kontroll-NK-Zellen ihre runde Zellform bei der Bildung der immunologischen Synapse mit NALM-16 Zellen beibehalten (siehe Abb. 24). Auch bei den CIML-NK-Zellen kann eine abgeflachte Zellform bei der Konjugatbildung mit den Tumorzellen beobachtet werden (siehe Abb. 24). Des Weiteren sind bei den TIML-NK-Zellen weit mehr F-Aktinreiche Zellfortsätze während der Konjugatbildung zu erkennen als bei den Kontroll- oder CIML-NK-Zellen (siehe Abb. 24; rote Pfeilspitze). Diese zytoskelettären bzw. zytoplasmatischen Ausstülpungen erinnern stark an sog. Filopodien, einer Form von Pseudopodien oder Scheinfüßchen.

Um mit Hilfe der konfokalen Aufnahmen die Menge des sekretierten Perforins während der Konjugatbildung zwischen den NK-Zellansätzen und den NALM-16 Tumorzellen quantitativ bestimmen zu können, wurden die Bilder mit der „Bitplane Imaris Image Analysis“ analysiert und die lytischen perforinhaltigen Granula der NK-Zellen sowie deren Fluoreszenzintensitäten detektiert (siehe Abb. 25). Die Analysen ergaben anhand der Summe der Perforin-Fluoreszenzintensität pro Zelle einen signifikant gesteigerten Perforingehalt bei den TIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll- und CIML-NK-Zellen während der Konjugatbildung (siehe Abb. 25).

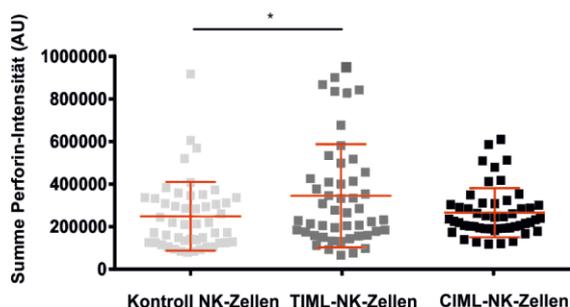


Abbildung 25: TIML-NK-Zellen zeigen eine verstärkte Perforin-Sekretion. Quantifizierung der Konfokal-Aufnahmen von Kontroll-, NALM-16-geprägten TIML- und CIML-NK-Zell/NALM-16-Konjugaten an Tag 7. Der Perforingehalt einer NK-Zelle ist als Summe der Perforin-Fluoreszenzintensität dargestellt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 NK-Zell-Spendern in 3 unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$.

Darüber hinaus wurden Experimente zur Konvergenz und Polarisation während der Konjugatbildung, welche in die Erkennungs-, Effektor- und in die Terminationsphase unterteilt wird, durchgeführt. Ein Merkmal für die Erkennungsphase ist die Konvergenz der lytischen Granula, welche bedeutet, dass die lytischen Granula nach Target-Kontakt am MTOC der NK-Zelle zusammenlaufen und dort aufeinandertreffen.

Die Konvergenz wurde quantifiziert, indem das MTOC als hellster Punkt der Tubulinfärbung festgelegt und die Distanz zwischen jedem Granulum und dem MTOC berechnet wurde. Für die Effektorphase sind die Aktinpolymerisation und die Polarisation des MTOC der NK-Zelle kennzeichnend, welche die Näherung des MTOC an die immunologische Synapse sowie die Fusion der lytischen Granula beschreibt. Die Polarisation wurde quantifiziert, indem die Distanz zwischen dem MTOC und der immunologischen Synapse errechnet wurde.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikant verringerte Konvergenz bei den TIML-NK-Zellen und CIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen in Form einer erhöhten Distanz zwischen den lytischen Granula und dem MTOC während der Konjugatbildung zwischen den NK-Zellansätzen und den NALM-16 Tumorzellen (siehe Abb. 26 A). Hingegen bleibt die Polarisation der TIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen anhand der Distanz zwischen MTOC und der immunologischen Synapse unverändert, während die CIML-NK-Zellen eine signifikant erhöhte Polarisation bei der Konjugatbildung zwischen den NK-Zellansätzen und den NALM-16 Tumorzellen aufweisen (siehe Abb. 26 B).

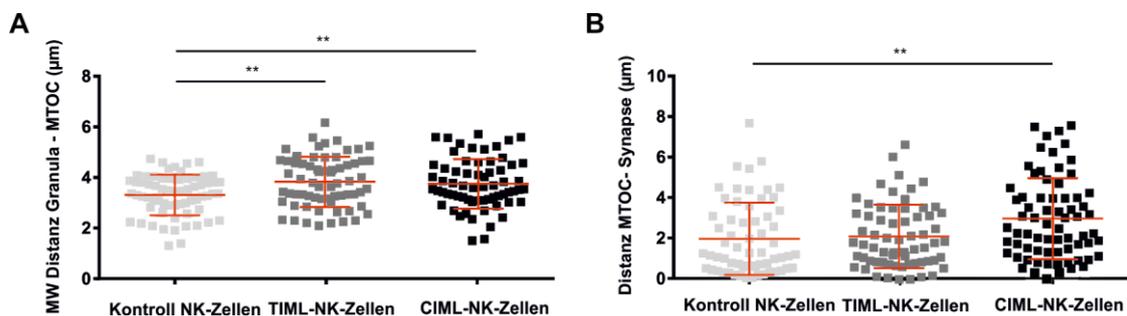


Abbildung 26: Ein Tumor-Priming führt zu einer verminderten Konvergenz während der Konjugatbildung von TIML-NK-Zellen und NALM-16 Tumorzellen. Quantifizierung der Konfokalaufnahmen von Kontroll-, NALM-16-geprimten TIML- und CIML-NK-Zell/NALM-16-Konjugaten an Tag 7. **(A)** Die Distanz zwischen den Granula und dem MTOC einer NK-Zelle, was als Konvergenz definiert wird, wurde als Distanz zwischen dem Mittelpunkt des Granulums und der nächstliegenden Oberfläche des MTOCs berechnet. **(B)** Die Distanz zwischen dem MTOC und der immunologischen Synapse einer NK-Zelle, was als Polarisation definiert wird, wurde als Distanz zwischen dem Mittelpunkt des MTOCs und der nächstliegenden Synapsenoberfläche berechnet. Jeder Messpunkt stellt eine NK-Zelle dar. Die Daten in **(A, B)** repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von 3 NK-Zell-Spendern aus 3 unabhängigen Experimenten. ** $p < 0.01$.

7. DISKUSSION

7.1 NK-Zellen – Teil des angeborenen oder adaptiven Immunsystems?

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die adaptiven Eigenschaften von NK-Zellen untersucht werden, um die bisher moderaten GvL-Effekte der NK-Zellen steigern zu können. Es konnte gezeigt werden, dass ein Tumor-Priming mit BCP-ALL-Zellen zu einer Tumor-spezifisch gesteigerten Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo*, einer erhöhten Vitalität und Proliferation, einer verstärkten Perforin-Sekretion sowie einer veränderten Formation der immunologischen Synapse der sog. Tumor-induzierten Memory-like NK-Zellen (TIML-NK-Zellen) führt. Trotz der verbreiteten Meinung, dass das angeborene Immunsystem kein immunologisches Gedächtnis besitzt, widersetzen sich NK-Zellen der konventionellen Zweiteilung in adaptiv und angeboren anhand mehrerer, in Tabelle 19 aufgeführter Punkte (Vivier *et al.*, 2011; Marcus und Raulet, 2013).

Tabelle 19: Angeborene und adaptive Eigenschaften der NK-Zellen

Charakteristika	Angeborene Immunzellen		Adaptive Immunzellen
	Granulozyten, Makrophagen/Monozyten, dendritische Zellen	NK-Zellen	B-, T-Zellen
Zellabstammung	Myeloid	lymphoid	lymphoid
Gene für wichtige Erkennungsrezeptoren	Keimbahn-kodierte Gene	Keimbahn-kodierte Gene	Rearrangierte Gene
Klonale Expression von Erkennungsrezeptoren	Nein	Ja (in manchen Fällen ¹)	Ja
Zellen unterziehen sich einem „Education“-Prozess um Autoreaktivität zu vermeiden	Unbekannt	Ja	Ja

NK-Zellen sind analog zu den B- und T -Zellen, basierend auf ihrer Morphologie und ihrem Ursprung aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle, lymphatischer Abstammung (Kondo *et al.*, 1997). Des Weiteren werden NK-Zellen, wie auch B- und T-Zellen, einem „Education“-Prozess unterzogen, welcher eine Autoreaktivität verhindern soll (Raulet und Vance, 2006).

¹ Rezeptoren der Ly49- und NKG2A-C-Genfamilien werden klonal verteilt exprimiert, während Rezeptoren wie NKp46 und NKG2D einheitlich exprimiert werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist, dass die Expressionsmuster mancher Keimbahn-kodierter Rezeptoren klonal verteilt sind und die Gesamtheit, der durch eine NK-Zelle exprimierten Rezeptoren, ihre Spezifikation bestimmt (Raulet *et al.*, 2001). Zudem gibt es seit langem Hinweise, dass naive NK-Zellen eine sehr schwache funktionelle Aktivität aufweisen bis sie durch Targetzellen *in vivo* prä-aktiviert werden, was auf eine adaptive Komponente der NK-Zellantwort hindeutet (Glas *et al.*, 2000). Ein letzter Punkt ist, dass eine Subpopulation von NK-Zellen identifiziert wurde, welche lange Zeit (über 6 Monate) in der Maus überleben kann (Sun *et al.*, 2011), was im Gegensatz zu den meisten anderen Zellen des angeborenen Immunsystems steht, welche nur eine kurze Lebensdauer haben. Die in der vorliegenden Arbeit erzielten Daten weisen auf neue, bisher unbeschriebene adaptive Eigenschaften der NK-Zellen in Form eines immunologischen Gedächtnisses nach einem Tumor-Kontakt hin.

7.2 Die zytotoxische Aktivität der TIML-NK-Zellen

In vitro Zytotoxizitätsassays demonstrierten, dass NK-Zellen, welche mit der BCP-ALL Zelllinie NALM-16 sowie mit den BCP-ALL Patientenblasten P31G oder P3B geprimed wurden, an Tag 7 der Kultur eine signifikant erhöhte zytotoxische Aktivität im Vergleich zu ungeprimten Kontroll-NK-Zellen aufwiesen (siehe Abb. 6, 7). Darüber hinaus zeigten TIML-NK-Zellen auch *in vivo* eine anti-leukämische Aktivität gegenüber BCP-ALL-Blasten (siehe Abb. 10). Eine Erhöhung der NK-Zellfunktionalität durch ein Tumor-Priming konnte bisher lediglich *in vitro* durch ein Priming mit der T-Zell-Leukämie Zelllinie CTV-1 beschrieben werden, was in der Induktion von sog. Tumor-aktivierten NK-Zellen (T-ANK) resultierte (North *et al.*, 2007). Die T-ANK wurden über Nacht mit der Zelllinie CTV-1 ko-kultiviert, was zu einer ungerichteten Steigerung der Zytotoxizität gegen verschiedene Tumorentitäten wie AML, CLL, Ovarialkarzinomen oder Brustkrebszellen in einem Zytotoxizitätsassay direkt am Tag nach dem Tumor-Priming führte (North *et al.*, 2007). Im Gegensatz hierzu wurden TIML-NK-Zellen an Tag -1 mit dem Tumor geprimed und fortan sieben Tage in Kultur gehalten, bis an Tag 7 eine funktionelle Testung erfolgte. Die Ergebnisse belegten, dass TIML-NK-Zellen im Unterschied zu den T-ANK Tumor-spezifisch reagieren, indem die TIML-NK-Zellen nur gegen den ursprünglich zum Priming verwendeten Tumor verstärkt reaktiv sind (siehe Abb. 9). Allgemein wird angenommen, dass für die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität sowohl ein Priming als auch ein sog. „Triggering“ der NK-Zelle benötigt wird (North *et al.*, 2007). Während das Priming-Signal unspezifisch durch z.B. IL-2, IFN- γ , oder auch durch eine Tumorzelle vermittelt werden kann, muss das Trigger-Signal spezifisch sein, um eine Autoreaktivität zu vermeiden. Ein potenzieller Kandidat für ein Tumor-spezifisches Erkennungssignal ist laut einer AML-Studie z.B. das Epitop der Tyrosinkinasedomäne des Hitzeschockproteins 70 (Gehrmann *et al.*, 2003). Die Rezeptoren, welche Trigger-Signale erkennen und die zytotoxische Aktivität vermitteln, sind noch weitestgehend unbekannt, umfassen aber bislang CD2, CD69, NKp46, NKp30 und NKp44 (North *et al.*, 2007).

Neuere Studien belegen, dass die Bindung dieser Rezeptoren alleine nicht ausreicht, um die Lyse von Targetzellen zu triggern und dass ruhende NK-Zellen zuerst unspezifisch mit IL-2 stimuliert werden müssen (Bryceson *et al.*, 2006). Diese Ergebnisse befürworten die Hypothese, in der frisch isolierte, ruhende NK-Zellen einen zweistufigen Prozess der Aktivierung und des Triggerns durchlaufen müssen, um zytotoxisch werden zu können. Im Gegensatz hierzu steht die Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC), in welcher ruhende NK-Zellen durch eine Bindung von CD16 direkt und ohne vorhergehendes Priming in der Lage sind, die Lyse von Tumorzellen zu triggern (Bryceson *et al.*, 2006). Tumorzellen, die gegenüber der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität als empfänglich gelten, sind in der Lage NK-Zellen zu primen und zu triggern, wohingegen NK-Zell-resistenten Tumorzellen wahrscheinlich entweder Priming- oder Trigger-Liganden fehlen und diese so nicht lysiert werden können. Im Falle der T-ANK wird vermutet, dass sie ähnlich zu den IL-2 aktivierten bzw. Lymphokin-aktivierten NK-Zellen (LAK) lediglich ein Trigger-Signal benötigen, um eine zytotoxische Aktivität zu induzieren (Bryceson *et al.*, 2006; North *et al.*, 2007). Im Gegensatz hierzu konnten NK-Zellen nicht mit RAJI- oder DAUDI- Zellen geprimed werden (North *et al.*, 2007). Jedoch sind diese Zellen selbst empfänglich gegenüber der Lyse von LAK oder T-ANK. CTV-1-Zellen selbst waren ebenfalls unempänglich gegenüber der Lyse ruhender NK-Zellen, da ihnen wahrscheinlich ein Trigger-Signal fehlte. Die Annahme eines fehlenden Trigger-Liganden wurde zusätzlich von der Tatsache unterstützt, dass CTV-1 auch nicht durch T-ANK oder LAK lysiert werden konnten (North *et al.*, 2007). Demnach werden ruhende NK-Zellen durch die Ko-Kultur mit CTV-1 geprimed, aber nicht getriggert und können so NK-Zellresistente Zellen, die einen oder mehrere Trigger-Liganden tragen, lysieren.

Die beiden verwendeten primären BCP-ALL-Blasten der Patienten P31G und P3B können aufgrund der sehr niedrigen Lyse durch die mit IL-2 kultivierten Kontroll- und CIML-NK-Zellen, als NK-Zellresistente Tumorzellen bezeichnet werden (siehe Abb. 7). NK-Zellen, welche jedoch mit IL-2 und entweder P31G oder P3B ko-stimuliert wurden, zeigten gegenüber dem identischen, nicht aber gegenüber anderen Tumoren, eine erhöhte zytotoxische Aktivität (Abb. 7, 9). Gegen einen ähnlichen Aktivierungsprozess von T-ANK und TIML-NK-Zellen spricht, dass CTV-1-Zellen selbst unempänglich gegenüber der Lyse ruhender NK-Zellen und auch gegenüber CTV-1-geprimten T-ANK oder LAK sind. Die Aktivität der T-ANKs ist zudem essentiell von dem Aktivierungsmarker CD69, welcher auf den T-ANKs hochreguliert wird, sowie vom STAT5-Signalweg abhängig (North *et al.*, 2007; Sabry *et al.*, 2011). Eine signifikante Hochregulation von CD69 und pSTAT5 konnte hingegen bei den TIML-NK-Zellen nicht beobachtet werden (siehe Abb. 14; pSTAT-Daten nicht angegeben). Ferner konnte die erhöhte Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen, wenn auch im Vergleich zu Tag 7 mit einem verminderten Effekt, ebenfalls an Tag 21 nachgewiesen werden (siehe Abb. 6). Bei den humanen CIML-NK-Zellen nahm die Fähigkeit, auf eine Restimulation mit IL-12/IL-15 mit einer gesteigerten IFN- γ -Produktion zu reagieren, ebenfalls bis hin zu Tag 21 ab (Romee *et al.*, 2012).

Zusammenfassend muss es sich bei der gesteigerten und langanhaltenden Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen um eine Gedächtnis-ähnliche adaptive Eigenschaft, nicht aber um einen kurzweiligen Aktivierungs-Effekt, ähnlich wie dem der T-ANK, handeln.

7.3 TIML-NK-Zellen zeigen keinen spezifischen Phänotypen

Untersuchungen zu den Oberflächenrezeptoren der TIML-NK-Zellen ergaben einen reifen $CD56^{br}$ $CD94^{hi}$ $NKG2A^{hi}$ $CD16^{hi}$ $CD57^{int}$ $KLRG1^{int}$ $inhKIR^{int}$ Phänotypen (siehe Abb. 13), welcher eine Zwischenstufe zwischen den weniger reifen $CD94^{hi}$ $NKG2A^{hi}$ $CD57^{-}$ $inhKIR^{-}$ NK-Zellen und der reifsten Stufe $CD94^{-}$ $NKG2A^{-}$ $CD57^{+}$ $inhKIR^{+}$ der NK-Zellentwicklung darstellt (Miller und McCullar, 2001; Bjorkstrom *et al.*, 2010; J. Yu *et al.*, 2010). Des Weiteren ergaben die Analysen keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Oberflächenrezeptoren zwischen den TIML- und den Kontroll-NK-Zellen (siehe Abb. 14). Studien zur MCMV-Infektion in der Maus belegten ebenfalls, dass MCMV-spezifische Memory-NK-Zellen phänotypisch den ruhenden NK-Zellen ähnelten (Sun und Lanier, 2011). Obwohl phänotypisch keine eindeutigen Marker existieren, um MCMV-spezifische $Ly49H^{+}$ NK-Zellen zu identifizieren, werden sie durch eine erhöhte Expression von $CD11b$, $KLRG1$ und $LY6C$ sowie dem Verlust der Expression von $CD27$ charakterisiert (Sun *et al.*, 2009). Eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von MCMV-induzierten Memory-NK-Zellen nimmt darüber hinaus das ko-stimulatorische Molekül $DNAM-1$ ein (Nabekura *et al.*, 2014). Dementsprechend wird dessen Ligand $CD155$ *in vivo* nach einer MCMV-Infektion überwiegend auf infizierten Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert.

In einer Studie zum Phänotypen von murinen Hapten-spezifischen Memory-NK-Zellen in Folge einer Dinitrofluorbenzol-(DNFB-) und Oxazolonsensibilisierung wurde demonstriert, dass $NK1.1^{+}$ $Thy1^{+}$ und $Ly49C/I^{+}$ hepatische NK-Zellen die Kontakt-Hypersensibilität (CHS) vermitteln (O'Leary *et al.*, 2006; Paust *et al.*, 2010). In dem Modell der DNFB-Induktion konnte eine leberständige CH-vermittelnde $DX5/CD49b^{+}$ $CD11b^{+}$ $CD27^{-}$ NK-Zellpopulation identifiziert werden (Majewska-Szczepanik *et al.*, 2012; Majewska-Szczepanik *et al.*, 2013). Hingegen konnte im Oxazolon-induzierten CH-Modell die Expression von $CD49a$, $NKp46$, $CXCR6$, $CD27$ und $CD51$, nicht aber von $DX5$ festgestellt werden (Peng *et al.*, 2013; Peng und Tian, 2015). Im Gegensatz hierzu zeigten die murinen CIML-NK-Zellen keinen eindeutigen Zelloberflächen-Phänotypen (Cooper *et al.*, 2009). Die humanen CIML-NK-Zellen besitzen hingegen einen eindeutigen Phänotypen, welcher mit einer Erhöhung der Expression von $CD94$, $NKG2A$, $NKp46$ und $CD69$ einhergeht (Romee *et al.*, 2012). Die Expression dieser Marker, inklusive $NKG2C$, korreliert mit der Produktion von $IFN-\gamma$ durch prä-aktivierte $CD56^{dim}$ NK-Zellen. Des Weiteren konnte eine Hochregulation von $CD25$ in humanen prä-aktivierten NK-Zellen beobachtet werden, welches den NK-Zellen ermöglicht, bereits auf kleinste IL-2-Mengen zu reagieren (Leong *et al.*, 2014).

Humane HCMV-spezifische Memory-NK-Zellen exprimieren den CD94-NKG2C-Rezeptor stark, während viele dieser Zellen sowohl CD57 als auch die aktivierenden KIR-Rezeptoren KIR2DS2, KIR2DS4 und KIR3DS1 ko-exprimieren und NKG2A herunterregulieren (Lopez-Verges *et al.*, 2011; Beziat *et al.*, 2013). Neueste Studien identifizierten eine „adaptive“ FcεRIγ⁺ NK-Zellsubpopulation, welche mit einer HCMV-Infektion assoziiert ist und eine erhöhte CD16-vermittelte Reaktion gegenüber HCMV-infizierten Targetzellen aufweist (T. Zhang *et al.*, 2013; J. Lee *et al.*, 2015). Interessanterweise konnte bei den TIML-NK-Zellen keine signifikante Hochregulation des aktivierenden Oberflächenantigens CD25 beobachtet werden (siehe Abb. 14), welches sowohl von humanen CIML-NK-Zellen als auch von HCMV-spezifischen Memory-NK-Zellen hochreguliert wird (Leong *et al.*, 2014; Rolle *et al.*, 2014). Auch eine signifikante Hochregulation Memory-spezifischer Marker wie CXCR6 im hepatischen CH-Modell und KLRG1 während einer MCMV-Infektion, sowie CD94/NKG2C und CD57 in HCMV-spezifischen Memory-NK-Zellen, konnte bei den TIML-NK-Zellen phänotypisch im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen nicht nachgewiesen werden (Sun *et al.*, 2009; Paust *et al.*, 2010; Lopez-Verges *et al.*, 2011).

7.4 Das Genexpressionsprofil der TIML-NK-Zellen unterscheidet sich von dem ruhender NK-Zellen

Die Analyse des Transkriptoms der TIML-NK-Zellen zeigte signifikante Variabilitäten zwischen den TIML-, CIML- und Kontroll-NK-Zellansätzen (siehe Abb. 15). Das hierarchische Clustering der NK-Zellansätze ergab bei drei der vier Spender eine ähnlichere Genexpression zwischen CIML- und Kontroll-NK-Zellen als zwischen TIML- und Kontroll-NK-Zellen (siehe Abb. 15). Untersuchungen zum Transkriptom muriner NK-Zellen demonstrierten ebenfalls eine charakteristische Genexpression von naiven (Tag 0), aktivierten (Tag 1,5) und Memory-NK-Zellen (Tag 30) als Resultat einer CMV-induzierten Re-Programmierung (Sun *et al.*, 2011). Ähnlich wie bei den TIML-NK-Zellen, bestätigen diese Analysen, dass sich die mRNA-Transkriptionsprofile ruhender NK-Zellen und Memory-NK-Zellen deutlich unterscheiden (Sun *et al.*, 2011). Auch bei murinen T-Zellen ist das mRNA-Transkriptionsprofil der Memory-T-Zellen in C57BL/6-Mäusen, welche mit LCM-Viren infiziert wurden, gegenüber naiven T-Zellen verändert (Wherry *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2008).

Die Analyse des Transkriptoms identifizierte des Weiteren signifikant hoch- und niederregulierte Gene in den NK-Zellansätzen (siehe Abb. 16). In den TIML-NK Zellen sind im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen unter anderem die Transkripte der Gene *IL-26*, *HDAC9*, *CCR2*, *CXCR6*, *IRAK3* und *IL17RA* signifikant hochreguliert, während die Transkripte der Gene *DUSP4*, *AGMAT*, *VDR* und *PDGFA* signifikant herunterreguliert sind (Eine ausführliche Auflistung der Gene inklusive der p-Werte findet sich im Anhang in Tab. 21-24).

Allgemein sind NK-Zellen nicht nur als reine zytotoxische Effektorzellen gegen virusinfizierte oder Tumor-Zellen zu verstehen, vielmehr können NK-Zellen die T- und B-Zellimmunität positiv oder negativ beeinflussen (Robbins *et al.*, 2007; Krebs *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2010). Die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität und Zytokinproduktion beeinflusst dendritische Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten und stattet NK-Zellen so mit regulatorischen Funktionen aus, welche sich nachfolgend auf die antigenspezifischen T- und B-Zellantworten auswirken (A. Moretta *et al.*, 2005). Es ist also denkbar, dass durch ein Tumor-Priming sowohl die T-Zellantworten als auch die anti-tumoralen Eigenschaften anderer Zelltypen intensiviert werden können. Einen solchen Hinweis gibt die Transkriptomanalyse, in welcher die Expression des Gens *IL26* in den TIML-NK-Zellen signifikant erhöht ist. IL-26 wird vornehmlich von T_H17- und Memory-T-Zellen, aber auch von NK-Zellen produziert und induziert via des IL-20R α - und IL-10R β -Rezeptorkomplexes die Phosphorylierung von STAT1 und STAT3, welche proliferative und anti-apoptische Effekte vermitteln (Wolk *et al.*, 2002; You *et al.*, 2013; Rutz *et al.*, 2014). Neuere Studien belegen, dass IL-26 als kationisches amphipathisches Protein ebenfalls dazu dient, extrazelluläre Erreger wie z.B. Bakterien über eine Membranporen-Formation zu eliminieren (Meller *et al.*, 2015). Darüber hinaus ist IL-26 in der Lage, bakterielle DNA zu komplexieren, was wiederum die Produktion von IFN- α durch dendritische Zellen induziert (Meller *et al.*, 2015).

IL-17A, der Ligand des IL17-Rezeptors (IL17-RA), ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches von aktivierten T-Zellen und T_H17-Zellen synthetisiert wird (Fossiez *et al.*, 1996). Obwohl IL-17A von T-Zellen produziert wird, fördert es die Expansion und Rekrutierung von angeborenen Immunzellen, kooperiert mit Toll-like-Rezeptor-Liganden, IL-1 β und TNF um inflammatorische Reaktionen und die Produktion von Effektor-Peptiden zu steigern (J. J. Yu und Gaffen, 2008). Ferner ist IL-1 neben viralen Infektionen, Mitogenen und Stress, einer der bekanntesten Regulatoren des NF- κ B-Signalweges, welcher u.a. über die Aktivierung der IL-1R-assozierte Kinase (IRAK) induziert wird (Croston *et al.*, 1995; Bankers-Fulbright *et al.*, 1996). Die IL-1R-assozierte Kinase 3 (IRAK3) und der ubiquitär exprimierte IL-17A-Rezeptor könnten demnach in TIML-NK-Zellen hochreguliert werden, um durch den Tumorkontakt entstehende Signale anderer Immunzellen, wie T-Zellen und Monozyten zu potenzieren und die adaptiven Effektorantworten der NK-Zellen zu verstärken.

Die Gene *CCR2* und *CXCR6* codieren für Chemokinrezeptoren, dessen Liganden CC-Chemokinligand 2 (CCL2) im Falle von CCR2 und Chemokin-CXC-Ligand16 (CXCL16) im Falle von CXCR6 sind. Während die Expression von CCR2 in NK-Zellen erst nach einer Aktivierung mit IL-2 induziert wird und dessen Ligand CCL2 die Chemotaxis der Monozyten sowie deren inflammatorische Antwort gegenüber Tumoren vermittelt, kommt CXCR6 eine zentrale Bedeutung für Induktion und Erhaltung der Hapten-spezifischen Memory-NK-Zellantwort in Mäusen zu (Polentarutti *et al.*, 1997; Paust *et al.*, 2010).

Interessanterweise konnte in TIML- im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen phänotypisch jedoch keine signifikante Hochregulation der Oberflächenrezeptoren CXCR6 und CCR2 festgestellt werden, was für eine post-transkriptionelle Regulation der beiden Gene spricht (siehe Abb. 14; CCR2-Daten nicht angegeben). Ähnlich wie bei den TIML-NK-Zellen wird *CCR2* auch in Memory T-Zellen überexprimiert (Wherry *et al.*, 2007; Sarkar *et al.*, 2008).

Die durch das Gen *HDAC9* codierte Histon-Deacetylase 9 der HDAC-Klasse IIa spielt eine wichtige Rolle in der Deacetylierung von Histonen, was sich direkt auf die Regulation der Transkription sowie den Zellzyklus auswirkt. Eine Inhibition der Klasse-I-Histon-Deacetylasen in NK-Zellen durch Valproat und den panHDAC-Inhibitor Vorinostat verringert die Proliferation und die zytotoxische Effektorfunktionen der NK-Zellen (Ogbomo *et al.*, 2007). Umgekehrt wäre somit eine Beteiligung von *HDAC9* an der gesteigerten Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen durchaus denkbar. Des Weiteren spricht auch die Herunterregulation des Gens *PDGFA* für die verstärkte zytotoxische Aktivität der TIML-NK-Zellen, welches für die α -Isoform des Wachstumsfaktors PDGF (Platelet-Derived Growth Factor α) codiert wird. PDGF steuert über den als Tyrosin-Kinase klassifizierten PDGF-Rezeptor (PDGFR) u.a. das Zellwachstum und die Zellteilung (Heldin, 1992). Vergangene Studien demonstrierten, dass alle Isoformen des Wachstumsfaktors PDGF die NK-Zellaktivität und deren Zytotoxizität inhibieren können (Gersuk *et al.*, 1991).

Weitere ontologische Untersuchungen des Transkriptionsprofils von TIML- und CIML-NK-Zellen belegen eine signifikant erhöhte Anzahl an regulierten Genen in den TIML-NK-Zellen (siehe Abb. 18). Die in den CIML-NK Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen signifikant überexprimierten Gene, sowie deren signifikant herunterregulierten Gene, stimmen nicht mit den regulierten Genen in den TIML-NK-Zellen überein (siehe Tab. 21-24). Abschließend kann demnach festgestellt werden, dass die andersartigen Genexpressionsprofile der TIML- und CIML-NK-Zellen auf unterschiedliche Konversionsmechanismen und somit auf zwei verschiedene Formen eines immunologischen Gedächtnisses hinweisen.

7.5 Ein Tumor-Priming fördert die Proliferation und Vitalität der TIML-NK-Zellen

Zellzyklusanalysen belegten einen signifikant früheren Eintritt (Tag 0) der TIML-NK-Zellen in die S-Phase, in welcher zur Vorbereitung für die Zellteilung die DNA-Replikation stattfindet, wohingegen die CIML-NK-Zellen erst später (Tag 3) in die S-Phase eintreten (siehe Abb. 19 C). Des Weiteren war die Frequenz der postsynthetisch bzw. prämitotisch und der damit in Vorbereitung zur Mitose stehenden G2/M-Phase⁺ Zellen an Tag 0 bei den TIML-NK-Zellen signifikant erhöht (siehe Abb. 19 D). Im Gegensatz zu den CIML-NK-Zellen, welche bis hin zu Tag 7 eine erhöhte Proliferationsneigung zeigten, synchronisierten sich die TIML-NK-Zellen im Verlauf der weiteren Kultur wieder mit dem Zellzyklus der Kontroll-NK-Zellen (siehe Abb. 19).

Die erhöhte Proliferationsneigung der TIML-NK-Zellen nach einem Tumor-Erstkontakt ähnelt zunächst einem als klonale Expansion bezeichneten Prozess, in dem naive antigenspezifische T- oder B-Zellen nach einem Erstkontakt mit einem Antigen proliferieren und sich dabei manche Zellen zu Memory-Zellen differenzieren (Williams und Bevan, 2007). Auch bei murinen NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass Ly49H⁺ NK-Zellen in MCMV-infizierten Mäusen einer klonalen Expansion unterzogen wurden (Dokun *et al.*, 2001; Bubic *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2009). Im Menschen wurde eine CD94-NKG2C⁺ NK-Zellpopulation identifiziert, welche bevorzugt während einer akuten HCMV-Infektion expandiert und daraufhin als Memory-NK-Zelle fortbesteht (Lopez-Verges *et al.*, 2011; Della Chiesa *et al.*, 2012; Foley *et al.*, 2012). Die Expansion von CD94-NKG2C⁺ NK-Zellpopulationen konnte des Weiteren auch bei Infektionen mit anderen Viren beobachtet werden, jedoch nur bei Individuen, welche anhaltend mit HCMV infiziert waren (Brunetta *et al.*, 2010; Bjorkstrom *et al.*, 2011; Beziat *et al.*, 2012).

Die erhöhte Proliferation der murinen und humanen CIML-NK-Zellen kann im Gegensatz zu der Expansion anderer antigenspezifischer Memory-NK-Zellen nicht als klonal im eigentlichen Sinne bezeichnet werden, da hier der Kontakt mit einem Antigen fehlt und die Proliferation lediglich durch die Stimulation mit den Zytokinen IL-12/IL-18 induziert wird (Cooper *et al.*, 2009; Romee *et al.*, 2012). Aufgrund der Tatsache, dass bisher kein eindeutiger Phänotyp der TIML-NK-Zellen identifiziert werden konnte und der Vermutung, dass die Konversion eher über die Stimulation mehrerer aktivierender NK-Zellrezeptoren als über ein einzelnes Antigen abläuft, macht das Modell einer klonalen Expansion der TIML-NK-Zellen per se unwahrscheinlich.

Weitere Untersuchungen zur Viabilität der TIML- und CIML-NK-Zellen zeigten an Tag 0 eine erhöhte Anzahl an früh- und spät apoptotischen Zellen (siehe Abb. 20 B, C). Während sich der Anteil der vitalen Zellen bei den TIML-NK-Zellen über Tag 3 bis hin zu Tag 7 erholt und dementsprechend der Anteil an vitalen Zellen zunimmt, nimmt die Frequenz an früh und spät apoptotischen Zellen bei den CIML- im Vergleich zu den Kontroll- und TIML-NK-Zellen an Tag 3 und Tag 7 stark zu (siehe Abb. 20 B, C). Ein Tumor-Priming begünstigt also die Vitalität der TIML-NK-Zellen im Verlauf der Kultur im Gegensatz zu einem Zytokin-Priming mit IL-12/18, welches zu einem Anstieg der Apoptose in den CIML-NK-Zellen führt. Während im Rahmen der adaptiven Immunantwort die meisten Effektorzellen nach der primären Immunantwort in Folge eines Erstkontakts mit einem Antigen in der Kontraktionsphase absterben, bleiben die antigenspezifischen Memory-Zellen im Vergleich zu den naiven antigenspezifischen Zellen in erhöhter Anzahl erhalten (Williams und Bevan, 2007). Die Kontraktionsphase scheint auch in der Gedächtnisbildung der NK-Zellen ein entscheidender Faktor zu sein (Dokun *et al.*, 2001; Williams und Bevan, 2007; Sun *et al.*, 2009). Die Apoptose der Effektor-T-Zellen und die Bildung des T-Zell-Memorys nach einer viralen Infektion sind von Bcl-2 und Bcl-2-regulierenden Proteinen wie BCL2L11 oder BIM abhängig (Grayson *et al.*, 2000; Hildeman *et al.*, 2002; Pellegrini *et al.*, 2003).

Die Kontraktion und Transition der Effektor-NK-Zellen in MCMV-spezifische Memory-NK-Zellen beruht gleichermaßen auf diesem apoptotischen Signalweg (Min-Oo *et al.*, 2014). Analog zur Konversion MCMV-spezifischer Memory-NK-Zellen, konnte bei den TIML-NK-Zellen ebenfalls eine Kontraktion anhand apoptotischer NK-Zellpopulationen nach einem Tumor-Erstkontakt beobachtet werden. Die Beobachtung einer nicht unmittelbar nach Zytokinstimulation einsetzenden und länger andauernden Apoptose bei den CIML-NK-Zellen, in Verbindung mit einer erhöhten Expression des Aktivierungsmarkers CD25, weisen hingegen auf die Induktion eines IL-12-vermittelten aktivierungsinduzierten Zelltodes (AICD) hin (Ortaldo *et al.*, 1997; Stacey *et al.*, 2011).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass ein Tumor-Priming die Proliferation der TIML-NK-Zellen induziert und somit die Frequenz der TIML-NK-Zellen trotz einer frühen apoptotischen Kontraktionsphase im Verlauf der Kultur erhöht ist (siehe Abb. 21). Und obwohl das Ausmaß der totalen Zellexpansion der TIML-NK-Zellen vergleichsweise moderat ist, spiegelt die Größenordnung die Proliferation von NK-Zellen nach einer MCMV-Infektion oder adoptiv-transferierter muriner CIML-NK-Zellen analog wider (Sun *et al.*, 2009; Keppel *et al.*, 2013).

7.6 Die erhöhte Zytotoxizität wird über eine verstärkte Perforin-Sekretion vermittelt

In vorherigen Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Tumor-Priming die Induktion von Tumor-induzierten Memory-like NK-Zellen bewirkt, welche eine stärkere und Tumor-spezifische Zytotoxizität *in vitro* und *in vivo* aufweisen. Um die funktionelle NK-Zellantwort nach Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen bezüglich der Synthese des Zytokins IFN- γ , der Sekretion des lytischen Proteins Perforin und der Degranulation zu bestimmen, wurden Kontroll-, TIML- und CIML-NK-Zellen an Tag 7 in intrazellulären Analysen untersucht. Die Daten ergaben, dass sowohl die Frequenz der Zellen, welche positiv für Perforin sind, als auch der quantitative Perforingehalt in den TIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen nach einer 6-stündigen Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen an Tag 7 signifikant verstärkt ist (siehe Abb. 22, 25).

Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den virusspezifischen Memory-NK-Zellen und den CIML-NK-Zellen in der Maus und im Menschen, welche auf eine Restimulation mit einer erhöhten IFN- γ -Produktion, nicht aber mit einer gesteigerten Perforin-Sekretion reagieren (Cooper *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2009; Romee *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Leong *et al.*, 2014; Luetke-Eversloh *et al.*, 2014). Studien in murinen CIML-NK-Zellen demonstrierten, dass die prä-aktivierten NK-Zellen quantitativ nicht mehr IFN- γ produzierten, sondern die Frequenz der IFN- γ -produzierenden Memory-like NK-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht war (Cooper *et al.*, 2009). Da ruhende murine NK-Zellen konstitutiv IFN- γ -mRNA-Transkripte aber kein IFN- γ -Protein exprimieren, ist es wahrscheinlich, dass epigenetische Modifikationen nicht direkt am *Ifng* Locus stattfinden.

Es ist wahrscheinlicher, dass diese Modifikationen eher an Loci auftreten, welche für die post-transkriptionelle oder post-translationale Regulation von IFN- γ verantwortlich sind, auch wenn diese Mechanismen noch nicht im Detail verstanden werden (Stetson *et al.*, 2003; Young und Bream, 2007). Ferner konnte im Menschen trotz einer erhöhten IFN- γ -Produktion nach Restimulation ebenfalls kein erhöhtes Level an IFN- γ -mRNA bei HCMV-spezifischen und CIML-NK-Zellen nachgewiesen werden (Romee *et al.*, 2012). Jedoch zeigten diese Memory-NK-Zellen eine epigenetische Modifikation in Form einer Demethylierung der *IFNG* CNS1 Region, welche die Transkription des *IFNG*-Locus erleichterte (Luetke-Eversloh *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit konnte weder bei den TIML-NK-Zellen, noch bei den CIML-NK-Zellen anhand der Analyse ihres Transkriptoms an Tag 7 eine signifikant erhöhte Anzahl an IFN- γ - oder Perforin-mRNA-Transkripten im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen festgestellt werden, obwohl sowohl die Frequenz der Perforin⁺ Zellen als auch deren Perforingehalt in den TIML-NK-Zellen nach einer Restimulation mit NALM-16 Tumorzellen signifikant verstärkt war (siehe Tab. 21-24). Die Synthese des lytischen Proteins Perforin korreliert im Menschen mit dem Reifegrad der NK-Zellen, sowie mit dem Level der CD56-Expression und wird am stärksten in CD56^{dim} NK-Zellen, welche das reifste NK-Zellstadium repräsentieren, beobachtet (Jacobs *et al.*, 2001; Freud und Caligiuri, 2006).

Studien aus der Maus und aus dem Menschen belegen ähnlich wie bei IFN- γ , dass die Expression und Synthese von Perforin sowohl über transkriptionelle, als auch über post-transkriptionelle Mechanismen reguliert werden. Perforin-mRNA und dessen Protein werden konstitutiv von den meisten reifen humanen NK-Zellen ohne einen jeglichen Stimulus exprimiert (Nakata *et al.*, 1992; Salcedo *et al.*, 1993; Jacobs *et al.*, 2001). Wurden humane NK-Zellen z.B. mit Zytokinen wie IL-2 oder IL-12 stimuliert, stieg die Perforin-Expression stark an, was auf eine erhöhte Transkriptionsrate des *PRF1*-Gens zurückzuführen war (Salcedo *et al.*, 1993; Zhou *et al.*, 2002). Ruhende NK-Zellen aus der Maus werden hingegen als minimal zytotoxisch beschrieben, da sie im Unterschied zu den humanen CD56⁺CD3⁻ NK-Zellen zwar reichlich Granzym A und nur wenig Granzym B oder Perforin enthalten, während die mRNA aller drei Gene gleichermaßen vorhanden ist (Grossman *et al.*, 2004; Bratke *et al.*, 2005). Eine Stimulation der murinen NK-Zellen mit den Zytokinen IL-2 und IL-15 induzierte jedoch gleiche Mengen an Granzym B- und Perforin-Proteinen ohne eine wesentliche Änderung der mRNA-Level (Fehniger *et al.*, 2007). Dieselben Regulationsmuster konnten *in vivo* bei einer MCMV-Infektion nachgewiesen werden (Fehniger *et al.*, 2007). Diese Daten lassen den Schluss zu, dass ruhende murine NK-Zellen aufgrund einer Blockade der Perforin- und Granzym B-mRNA-Translation nur minimal zytotoxisch sind und diese Blockade durch eine Stimulation der NK-Zellen aufgehoben wird (Fehniger *et al.*, 2007).

Anzumerken gilt, dass ähnlich wie murine NK-Zellen, humane CD56^{bright} NK-Zellen auch nur minimal zytotoxisch sind und wenig Granzym B oder Perforin, aber eine beträchtliche Menge Granzym A enthalten. Allerdings zeigen die humanen CD56^{bright} NK-Zellen nach einer Aktivierung mit Zytokinen eine hohe zytotoxische Aktivität, was die gewonnenen Erkenntnisse aus der Maus um das Modell einer post-transkriptionellen Regulation von Perforin untermauert (Cooper *et al.*, 2001; Bratke *et al.*, 2005).

Eine transkriptionelle Regulation in Form einer erhöhten Transkriptionsrate des *PRFI*-Gens konnte in unserem vorliegenden System der TIML-NK-Zellen über die Transkriptomanalyse an Tag 7 ausgeschlossen (siehe Tab. 21-24) werden. Hierfür spricht unterstützend, dass die TIML-NK-Zellen keine Hochregulation von CD25 (siehe Abb. 14), dem Rezeptor für IL-2, oder phosphoryliertem STAT5 (Daten nicht angegeben) zeigen, welche direkt die -15 und -1 kb Enhancer des *PRFI*-Gens stimulieren und zu dessen Expression führen (C. R. Yu *et al.*, 1999; J. Zhang *et al.*, 1999). Das Modell einer post-transkriptionellen Regulation über die Aufhebung einer Blockade der Perforin-mRNA-Translation durch eine Restimulation mit Tumorzellen, ist auch bei den TIML-NK-Zellen durchaus denkbar. Eine vorausgehende „Bewaffnung“ von zytotoxischen Lymphozyten mit Effektor-mRNAs ist ein generell möglicher Mechanismus, um Zellen zu befähigen, schnell auf potentiell gefährliche Stimuli reagieren zu können.

7.7 Die veränderte Synapsenbildung der TIML-NK-Zellen

Konfokale Aufnahmen zur Untersuchung der immunologischen Synapse der TIML-NK-Zellen zeigen, dass die gesamte Zellform der TIML-NK-Zellen während der Konjugatbildung mit NALM-16 Zellen abgeflacht und somit die Zelloberfläche vergrößert erscheint (siehe Abb. 24; weiße Pfeilspitze), wohingegen die Kontroll-NK-Zellen ihre runde Zellform bei der Bildung der immunologischen Synapse mit NALM-16 Zellen beibehalten (siehe Abb. 24). Die feste Adhäsion an die Zielzelle, sowie die Polymerisierung des F-Aktins in den NK-Zellen, führen als erste Schritte während der Effektorphase der Konjugatbildung zu solch einer Abflachung der Effektorzelle und einem vergrößerten Synapsendurchmesser (Gismondi *et al.*, 2000; Orange *et al.*, 2002; Orange *et al.*, 2003; Wulfing *et al.*, 2003). Diese Änderung der Zellform ist ein Aktin-abhängiger Prozess, da NK-Zellen, welche mit einem Aktin-Inhibitor behandelt wurden, keine solch charakteristische Veränderung ihrer Zellform zeigen (Orange *et al.*, 2002). Die Annahme einer durch F-Aktin regulierten Synapsenbildung wird dadurch untermauert, dass NK-Zellen während der Bildung einer inhibitorischen Synapse eine rundere Zellform beibehalten (Mace *et al.*, 2014). Auch im Falle der stark vergrößerten und veränderten Zelloberfläche der TIML-NK-Zellen wäre eine gesteigerte Polymerisationsrate des F-Aktins gegenüber den Kontroll-NK-Zellen durchaus denkbar.

Des Weiteren sind bei den TIML-NK-Zellen weit mehr F-Aktinreiche Zellfortsätze während der Konjugatbildung zu erkennen als bei den Kontroll- oder CIML-NK-Zellen (siehe Abb. 24; rote Pfeilspitze). Diese zytoskelettären Ausstülpungen erinnern stark an sog. Filopodien, eine Form von Pseudopodien oder Scheinfüßchen. Studien belegen, dass z.B. Makrophagen ihre Filopodien als Fangarme einsetzen, um gebundene Objekte zu sich zu ziehen und sie sich per Phagozytose einzuverleiben (Kress *et al.*, 2007). Während der Erkennungsphase der Konjugatbildung kommt es nach einem initialen Kontakt zwischen NK- und Zielzelle zur Ausbildung von sog. Nanotubes. Diese Nanotubes scheinen als interzelluläre Seile zu dienen, welche den NK-Zellen helfen, sie in Richtung der Zielzellen zu leiten, wobei der letztendliche Mechanismus der Nanotube-Formation sowie deren physiologisches Vorkommen noch nicht abschließend geklärt sind (Chauveau *et al.*, 2010; Comerci *et al.*, 2012). Um welche zytoskelettäre Struktur es sich im Falle der TIML-NK-Zellen genau handelt konnte morphologisch nicht vollständig geklärt werden, jedoch könnten die vielen F-Aktinreichen Zellfortsätze ebenfalls der Erkennung und Bindung von Tumorzellen dienen.

Weitere Ergebnisse demonstrieren eine signifikant verringerte Konvergenz bei den TIML-NK-Zellen und CIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen in Form einer erhöhten Distanz zwischen den lytischen Granula und dem MTOC während der Konjugatbildung zwischen den NK-Zellansätzen und den NALM-16 Tumorzellen (siehe Abb. 26 A). Hingegen bleibt die Polarisation des MTOC der TIML-NK-Zellen im Vergleich zu den Kontroll-NK-Zellen anhand der Distanz zwischen MTOC und der immunologischen Synapse bei der Konjugatbildung zwischen den NK-Zellen und den NALM-16 Tumorzellen unverändert (siehe Abb. 26 B).

Die Polarisation des MTOC und der lytischen Granula ist ein essentieller Schritt für die Zytotoxizität der NK-Zelle und tritt während der Effektorphase auf (Mace *et al.*, 2014). Vor der Polarisation bewegen sich die lytischen Granula in der Erkennungsphase jedoch schnell in Richtung MTOC, wo sie in einem als Konvergenz bezeichneten Prozess zusammenlaufen und aufeinandertreffen (Mentlik *et al.*, 2010; James *et al.*, 2013). Diese minus-gerichtete Bewegung der lytischen Granula ist von der Funktion der Dynein-Motorproteine abhängig, nicht aber von der Aktinpolymerisation oder der Dynamik von Mikrotubuli. Eine Konvergenz der Granula tritt sowohl auf, wenn eine NK-Zelle an eine Zielzelle bindet, welche empfänglich gegenüber der NK-Zelllyse ist, als auch bei einer resistenten Targetzelle innerhalb einer inhibitorischen Synapse (Mentlik *et al.*, 2010). Diese Beobachtung unterstreicht, dass die Konvergenz der lytischen Granula den Schritt vor der letztendlichen Festlegung der Zytotoxizität einer NK-Zelle darstellt, nicht aber zu dessen Vorbereitung dient. Dementsprechend ist allein die Ligation von CD28 oder LFA-1 für die Induktion der Konvergenz ausreichend (Mentlik *et al.*, 2010). Da eine Beeinträchtigung der Expression von LAMP-1 (CD107a) in einer eingeschränkten Motilität der lytischen Granula resultiert, wird vermutet, dass LAMP-1 die Interaktion der Granula mit den Dyneinen vermittelt (Krzewski *et al.*, 2013).

Interessanterweise ist die Polarisation des MTOC in LAMP-1-defizienten Zellen intakt, was darauf hinweist, dass die Konvergenz der lytischen Granula keine Voraussetzung für eine funktionierende Polarisation darstellt (Krzewski *et al.*, 2013). Die Konvergenz repräsentiert wahrscheinlich den finalen Knotenpunkt, an welchem NK-Zellen noch empfindlich gegenüber einer inhibitorischen Signalgebung sind, bevor sie letzten Endes ihre zytotoxischen Effektorfunktionen ausüben. Im Gegensatz zur Konvergenz ist die Polymerisation von F-Aktin für die Polarisation des MTOC essentiell (Orange *et al.*, 2002; Orange *et al.*, 2003; Krzewski *et al.*, 2008). Die signifikant verringerte Konvergenz und die damit erhöhte Distanz zwischen den lytischen Granula und dem MTOC bei den TIML-NK-Zellen kann die Folge der stark vergrößerten und veränderten Zelloberfläche der TIML-NK-Zellen sein. Jedoch führen die feste Adhäsion und die Polymerisierung des F-Aktins in den NK-Zellen erst in der Effektorphase zu einer veränderten Zellform während der Konjugatbildung, nicht aber in der Erkennungsphase, in welcher die Konvergenz stattfindet. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass die TIML-NK-Zellen bereits vor der Konjugatbildung eine andersartige Zellform besitzen. Da die Konvergenz der lytischen Granula keine Bedingung für die Polarisation des MTOC darstellt und diese bei den TIML-NK-Zellen unverändert bleibt, hat dies auch keine negativen Auswirkungen auf die offensichtlich verstärkte Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen.

Einen weiteren wichtigen Aspekt stellt die Terminationsphase während der Synapsenbildung dar. Die hierbei möglicherweise auftretenden seriellen Targetzelllysen können Kinetiken zeigen, in welchen auf eine erste verzögerte Lyse viele schnelle Lysen folgen (Choi und Mitchison, 2013). Es wird davon ausgegangen, dass der hierfür zugrunde liegende Mechanismus eine Art von kinetischem Priming repräsentiert, in welchem NK-Zellinteraktionen von den deren letzten Zelllysen abhängen. Ferner wird in diesem System eine Aufrechterhaltung der Signalgebung vermutet, in welcher Interaktionen mit alten Targetzellen bestehen bleiben, bis eine neue Zielzelle gefunden wird (Choi und Mitchison, 2013). Demnach verbleiben die lytischen Granula nach einer Targetzelllyse zur Vorbereitung der nachfolgenden Lysen konvergiert am MTOC (Mentlik *et al.*, 2010; James *et al.*, 2013). In wie weit die gesteigerte Targetzelllyse der TIML-NK-Zellen von seriellen Lysen und deren Kinetiken abhängt, konnte anhand der vorliegenden Konfokalaufnahmen nicht geklärt werden. Daher kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob viele aufeinanderfolgende Interaktionen oder eher ein länger andauernder Kontakt zu der funktionell gesteigerten NK-Zellantwort der TIML-NK-Zellen führten.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine veränderte Synapsenbildung der TIML-NK-Zellen während der Restimulation mit NALM-16-Tumorzellen, welche möglicherweise aufgrund einer vergrößerten Zelloberfläche und der vielen F-Aktinreichen Zellfortsätze zu einer effizienteren Perforin-Sekretion sowie einer besseren Erkennung und Bindung von Tumorzellen führen könnte.

7.8 Unterschiede und Gemeinsamkeiten der humanen Memory-NK-Zellen

Bisher konnten humanen NK-Zellen adaptive Eigenschaften nach einer HCMV-Infektion oder nach einer Stimulation mit Zytokinen nachgewiesen werden (Guma *et al.*, 2006; Lopez-Verges *et al.*, 2011; Foley *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2012). Da die hier vorliegenden Daten auf eine neue, bisher unbeschriebene adaptive Eigenschaft der humanen NK-Zellen nach einem Tumor-Kontakt hinweisen, sollen im Folgenden abschließend Unterschiede und Gemeinsamkeiten der humanen Memory(-like)-NK-Zellen aufgezeigt und zusammengefasst werden (siehe Tabelle 20).

Eine der größten Unterschiede ist, dass HCMV-spezifische Memory-NK-Zellen im Unterschied zu den humanen CIML- und TIML-NK-Zellen klonal expandiert werden und des Weiteren einen distinkten $CD94/NKG2C^+CD57^+NKG2A^-$ Phänotypen besitzen (Lopez-Verges *et al.*, 2011). Während die humanen CIML-NK-Zellen durch eine Erhöhung der Expression von CD94, NKG2A, NKp46, CD25 und CD69 gekennzeichnet werden, zeigen TIML-NK-Zellen keine phänotypischen Auffälligkeiten und unterscheiden sich kaum von dem Phänotypen der Kontroll-NK-Zellen (Romee *et al.*, 2012; Leong *et al.*, 2014). Weitere Unterschiede lassen sich dadurch beobachten, dass sowohl HCMV-spezifische als auch humane CIML-NK-Zellen auf eine Restimulation mit einer erhöhten IFN- γ -Sekretion reagieren, wobei TIML-NK-Zellen nach einer Restimulation mit Tumorzellen sowohl qualitativ als auch quantitativ mehr Perforin produzieren (Foley *et al.*, 2012; Ni *et al.*, 2012; Romee *et al.*, 2012; Luetke-Eversloh *et al.*, 2014). Wohingegen HCMV-spezifischen und humanen CIML-NK-Zellen bisher nur indirekte anti-tumorale Eigenschaften durch eine verstärkte IFN- γ -Synthese nachgewiesen werden konnten, demonstrierten die TIML-NK-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine gesteigerte zytotoxische Aktivität (Menard *et al.*, 2009; Romee *et al.*, 2012). Die Untersuchungen belegen auch erstmals eine erhöhte Zytotoxizität der humanen CIML-NK-Zellen gegen einige BCP-ALL Tumorzelllinien *in vitro*.

Ähnlichkeiten bestehen bei der Konversion zu Memory-like NK-Zellen zwischen den TIML- und CIML-NK-Zellen, welche beide, wenn auch im Verlauf der Kultur zu unterschiedlichen Zeitpunkten und in unterschiedlichem Ausmaß, eine erhöhte Proliferationsneigung sowie eine durch Apoptose gekennzeichnete Kontraktionsphase aufweisen. Jedoch konnte bisher nicht geklärt werden, welcher Stimulus ursächlich für die einsetzende Apoptose beider Memory-like NK-Zellen ist. Ob eine ähnliche Kontraktion und Transition der Effektor- zu Memory-Zellen auch in HCMV-spezifischen Memory-NK-Zellen stattfindet, ist bisher nicht bekannt. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind die letztendlichen Mechanismen, mit welchen Viren, Zytokine oder auch Tumorzellen die Konversion zu Memory(-like)-NK-Zellen im Menschen bewirken, ungeklärt.

Tabelle 20: Übersicht der humanen Memory NK-Zellen

	HCMV-spezifische Memory NK-Zellen	CIML-NK-Zellen	TIML-NK-Zellen
Generierung	HCMV Infektion	Präaktivierung mit IL-12/15/18 (16 h)	Priming mit bestrahlten Leukämieblasten
Phänotyp	CD94/NKG2C ^{hi} CD57 ^{hi} NKG2A ⁻ KIR2DS2 ⁺ KIR2DS4 ⁺ KIR3DS1 ⁺ FcεRIγ ⁻	CD25 ^{hi} CD94 ^{hi} NKG2A ^{hi} NKG2C ^{hi} CD69 ^{hi} NKp46 ^{hi}	CD56 ^{br} CD94 ^{hi} NKG2A ^{hi} CD16 ^{hi} CD57 ^{int} KLRG1 ^{int} inhKIR ^{int}
Essentielle Liganden/Trigger	HLA-E, IL-12	IL-12, IL-18	?
Funktionelle Charakteristika	Vereinfachte IFN-γ Transkription Immunität gegenüber HCMV-infizierten Zellen	IFN-γ Produktion nach Restimulation IL-12/15 oder K562 ↑ Anti-tumorale Wirkung?	<i>In vitro</i> Zytotoxizität ↑ <i>In vivo</i> Leukämiebelast ↓ Perforin Produktion nach Tumor-Restimulation ↑
Antigenspezifität	Ja	Nein	?
Klonale Expansion	+++	Nein	?
Proliferation	+++	++	++
Kontraktion	?	++ (Apoptose)	+ (Apoptose)
Epigenetische Modifikation	Demethylierung <i>IFNG</i> CNS1 Region	Demethylierung <i>IFNG</i> CNS1 Region	?
Mechanismus	?	?	?
Signalmoleküle	Verlust von SYK, EAT2, PLZF	IL-2-CD25-STAT5	?
Referenzen	(Guma <i>et al.</i> , 2004; Guma <i>et al.</i> , 2006; Lopez-Verges <i>et al.</i> , 2011; Della Chiesa <i>et al.</i> , 2012; Foley <i>et al.</i> , 2012; Beziat <i>et al.</i> , 2013; T. Zhang <i>et al.</i> , 2013; Luetke-Eversloh <i>et al.</i> , 2014; Rolle <i>et al.</i> , 2014; J. Lee <i>et al.</i> , 2015; Schlums <i>et al.</i> , 2015)	(Ni <i>et al.</i> , 2012; Romee <i>et al.</i> , 2012; Leong <i>et al.</i> , 2014; Luetke-Eversloh <i>et al.</i> , 2014)	-

7.9 Mechanismen zur Konversion von Memory-NK-Zellen

Obwohl der genaue Mechanismus, welcher die Konversion zu HCMV-spezifischen NK-Zellen bewirkt, bisher ungeklärt ist, belegen *in vitro* Experimente, in welchen HCMV-infizierte HLA-E-defiziente Fibroblasten mit NK-Zellen kokultiviert wurden, dass die Interaktion von CD94-NKG2C mit seinem Ligand HLA-E die Expansion der CD94-NKG2C⁺ NK-Zellpopulation steuert. In diesem System ist, zusätzlich zur Interaktion mit HCMV-infizierten Fibroblasten, sowohl der Zell-Zell-Kontakt mit CD14⁺ Monozyten als auch der Kontakt mit IL-12, welches durch CD14⁺ Monozyten produziert wird, essentiell für die Expansion der der CD94-NKG2C⁺ NK-Zellpopulation (Guma *et al.*, 2006; Rolle *et al.*, 2014).

Bei den murinen Hapten-spezifischen NK-Zellen konnten die CHS-Reaktionen durch blockierende Antikörper gegen NKG2D, P- und E-Selektine sowie CD18 unterbunden werden (O'Leary *et al.*, 2006). Ferner blieben CHS-Reaktionen hepatischer NK-Zellen aus Hapten-sensibilisierten *Il12^{-/-}*, *Ifng^{-/-}* oder *Ifnar1^{-/-}* Mäusen nach adoptivem Transfer in den restimulierten Empfängermäusen aus, was den Zytokinen IL-12, IFN- γ und den Typ-I-Interferonen eine wichtige Rolle in der Generierung der Hapten-spezifischen NK-Zellantwort zuschreibt (Majewska-Szczepanik *et al.*, 2013). Es wurde darüber hinaus gezeigt, dass Hapten-modifizierte B-Zellen bevorzugt von hepatischen NK-Zellen aus Mäusen, welche mit demselben Hapten sensibilisiert wurden, lysiert werden (Paust *et al.*, 2010). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass NK-Zellen Hapten-modifizierte Moleküle auf der Oberfläche von B-Zellen erkennen können. Dieselbe Studie offenbarte auch, dass die NK-Zellen aus CXCR6-defizienten Mäusen oder Mäusen, die mit einem anti-CXCR6 oder anti-CXCL16 Antikörper behandelt wurden, keine CHS-Reaktionen zeigten und unfähig waren, Hapten-modifizierte B-Zellen zu lysieren (Paust *et al.*, 2010). Die Tatsache, dass CXCR6⁺ NK-Zellen (oder Thy1⁺CD11b⁺CD27⁻ und Thy1⁺Ly49C/I⁺ NK-Zellen) auch in der Milz und in der Leber von unsensibilisierten Mäusen gefunden wurden, diese aber keine CHS-Reaktionen vermitteln oder Hapten-modifizierte B-Zellen *in vitro* lysieren können, deutet auf die Notwendigkeit einer dualen Stimulation hin. Neben Leber-spezifischen Zytokinen/Chemokinen sind inflammatorische Stimuli, welche mit der Sensibilisierung durch Haptene oder der Immunisierung durch virusähnliche Partikel assoziiert sind, Voraussetzung für die Induktion von antigenspezifischen NK-Zellen, oder der Expression von putativen antigenspezifischen Rezeptoren in hepatischen NK-Zellen.

Welche Signale inhibieren die Apoptose in der murinen Ly49H⁺-Subpopulation im MCMV-Modell und erlauben ihr die Transition zu langlebigen Memory-NK-Zellen? Diese Frage gilt es noch zu klären, wobei es wahrscheinlich ist, dass Zytokine, welche für das Überleben der Zelle wichtig sind, bei diesem Prozess involviert sind (Sun und Lanier, 2011).

Während IL-15 jedoch für die Generierung von Ly49H⁺ Memory-NK-Zellen unwichtig ist, tragen sowohl IL-18 als auch IL-33 zur Expansion der MCMV-spezifischen NK-Zellen, aber nicht zur Generierung des MCMV-spezifischen Gedächtnisses bei (Sun *et al.*, 2009; Madera und Sun, 2015; Nabekura *et al.*, 2015). Die antigenspezifische Expansion der Ly49H⁺ NK-Zellen in MCMV-infizierten Mäusen ist des Weiteren entscheidend von dem Zytokin IL-12 und dem Signalmolekül STAT4 abhängig. NK-Zellen, welche keinen Rezeptor für IL-12 exprimierten, zeigten keine Antigen-abhängige Proliferation in Folge einer MCMV-Infektion (Sun *et al.*, 2012). Die während einer MCMV-Infektion produzierten Zytokine IL-12 und IL-18 führen zudem zu einer Hochregulation von CD25, der IL-2R α Untereinheit des IL-2-Rezeptors in NK-Zellen, welcher es ihnen ermöglicht bereits auf kleinste IL-2-Mengen zu reagieren (S. H. Lee *et al.*, 2012).

Auch der letztendliche Mechanismus mit welchem Zytokine die Konversion zu murinen oder auch zu humanen Memory-like NK-Zellen bewirken und eine gesteigerte IFN- γ -Effektorantwort auslösen, ist bisher ungeklärt. Genauso unklar ist, ob alle Zytokin-induzierten NK-Zellen oder nur eine Subpopulation von ihnen mit diesen Gedächtnis-ähnlichen Fähigkeiten ausgestattet sind.

Im Falle der TIML-NK-Zellen konnte die erhöhte Funktionalität gegenüber mehreren, phänotypisch heterogenen BCP-ALL-Proben, sowie Zelllinien demonstriert werden, die verschiedene NK-Zellrezeptor-Liganden in variablen Ausmaßen exprimierten (siehe Abb. 5). Daher war die Identifikation einer bestimmten Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR)/NCR-Liganden-Achse, welche die Konversion zu TIML-NK-Zellen initiiert, sehr unwahrscheinlich. Trotz der vorhandenen Expression des Zytotoxizitätsrezeptors NKG2D auf den TIML-NK-Zellen und einer wesentlichen Expression der NKG2D-Liganden auf den BCP-ALL-Tumorzellen, konnte keine signifikante Niederregulation des NKG2D-Rezeptors in Folge eines Tumor-Primings festgestellt werden (siehe Abb. 5, 13, 14), was gegen eine Beteiligung der NKG2D/NKG2D-L-Achse bei der Induktion von TIML-NK-Zellen spricht (Oppenheim *et al.*, 2005; Coudert *et al.*, 2008). Obwohl Mechanismen festgestellt werden konnten, welche zum Teil ursächlich für die verstärkte Funktionalität der TIML-NK-Zellen sein könnten, gilt es die intrazelluläre Signaltransduktion, die die Konversion zu TIML-NK-Zellen einleitet, noch aufzuklären.

7.10 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Tumor-Priming mit BCP-ALL-Tumorzellen zu einer Tumor-spezifisch gesteigerten Zytotoxizität, einer erhöhten Vitalität und Proliferation, einer verstärkten Perforin-Sekretion sowie einer veränderten Formation der immunologischen Synapse der sog. Tumor-induzierten Memory-like NK-Zellen (TIML-NK-Zellen) führt. Die Tatsache, dass die Zellen der NK-Zell-Spender in der vorliegenden Arbeit nicht nach ihrer grundlegenden zytotoxischen Leistungsfähigkeit, oder nach einer vorhandenen Alloreaktivität aufgrund eines KIR-Ligand-Mismatch ausgewählt wurden, unterstützt die These einer Wirksamkeit eines Tumor-Primings, um die GvL-Effekte der NK-Zellen in der Therapie von akuten kindlichen lymphatischen B-Zell Vorläufer-Leukämien steigern zu können. Demzufolge stellt ein Tumor-Priming eine vielversprechende Methode dar, welche in künftige NK-Zelltransfer-Therapieprotokolle miteinbezogen werden könnte. Vorangegangene Studien, die sich mit der Verbesserung von adoptiven NK-Zelltransfer-Therapien beschäftigten, nutzten das Potenzial naiver NK-Zellen aktiviert oder expandiert werden zu können und bezogen neben der Optimierung der Spenderauswahl sowohl die *ex vivo* oder *in vivo* Stimulation der NK-Zellen mittels Zytokinen, den Gebrauch von ADCC-induzierenden Antikörpern sowie die Blockade inhibitorischer KIR und den Einsatz von NK-Zell-CARs (Chimeric antigen receptors) in die NK-Zelltherapie ein (Handgretinger *et al.*, 2016).

Im Gegensatz hierzu bringt die Ausschöpfung der adaptiven Eigenschaften der NK-Zellen den entscheidenden Vorteil mit sich, dass die funktionelle Konversion langandauernd ist und vermutlich auf einer zellulären Reprogrammierung beruht. Jedoch müssen künftig noch viele Fragen zur funktionellen Konversion der TIML-NK-Zellen beantwortet werden: Welche Rolle spielen Antigen-abhängige Rezeptor-Liganden-Interaktionen? Welche Signaltransduktionsmechanismen bewirken die verstärkte Perforin-Sekretion und die veränderte Bildung der immunologischen Synapse? In welcher Weise werden der Zellzyklus und die Kontraktionsphase kontrolliert?

Die Verwendung von Tumor-induzierten Memory-like NK-Zellen zur Therapie von akuten kindlichen lymphatischen B-Zell Vorläufer-Leukämien würde eine neue, auf den Patienten zugeschnittene und individualisierte Behandlungsstrategie darstellen, in der in einem zweistufigen Protokoll zunächst die Konversion zu TIML-NK-Zellen durch ein Tumor-Priming induziert wird und diese Zellen in einem zweiten Schritt noch weiter expandiert und aktiviert werden.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- Abdul-Careem, M. F., Lee, A. J., Pek, E. A., Gill, N., Gillgrass, A. E., Chew, M. V., Reid, S. and Ashkar, A. A. (2012). Genital HSV-2 infection induces short-term NK cell memory. *PLoS One*, 7(3), e32821.
- Andre, P., Biassoni, R., Colonna, M., Cosman, D., Lanier, L. L., Long, E. O., Lopez-Botet, M., Moretta, A., Moretta, L., Parham, P., Trowsdale, J., Vivier, E., Wagtmann, N. and Wilson, M. J. (2001). New nomenclature for MHC receptors. *Nat Immunol*, 2(8), 661.
- Andrews, D. M., Estcourt, M. J., Andoniou, C. E., Wikstrom, M. E., Khong, A., Voigt, V., Fleming, P., Tabarias, H., Hill, G. R., van der Most, R. G., Scalzo, A. A., Smyth, M. J. and Degli-Esposti, M. A. (2010). Innate immunity defines the capacity of antiviral T cells to limit persistent infection. *J Exp Med*, 207(6), 1333-1343.
- Andrin, C., Pinkoski, M. J., Burns, K., Atkinson, E. A., Krahenbuhl, O., Hudig, D., Fraser, S. A., Winkler, U., Tschopp, J., Opas, M., Bleackley, R. C. and Michalak, M. (1998). Interaction between a Ca²⁺-binding protein calreticulin and perforin, a component of the cytotoxic T-cell granules. *Biochemistry*, 37(29), 10386-10394.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Reviron, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. and Vivier, E. (2006). Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*, 25(2), 331-342.
- Annesley, C. E. and Brown, P. (2015). Novel agents for the treatment of childhood acute leukemia. *Ther Adv Hematol*, 6(2), 61-79.
- Arnon, T. I., Achdout, H., Lieberman, N., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Katz, G., Bar-Ilan, A., Bloushtain, N., Lev, M., Joseph, A., Kedar, E., Porgador, A. and Mandelboim, O. (2004). The mechanisms controlling the recognition of tumor- and virus-infected cells by NKp46. *Blood*, 103(2), 664-672.
- Baer, M. R., George, S. L., Caligiuri, M. A., Sanford, B. L., Bothun, S. M., Mrozek, K., Koltz, J. E., Powell, B. L., Moore, J. O., Stone, R. M., Anastasi, J., Bloomfield, C. D. and Larson, R. A. (2008). Low-dose interleukin-2 immunotherapy does not improve outcome of patients age 60 years and older with acute myeloid leukemia in first complete remission: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *J Clin Oncol*, 26(30), 4934-4939.
- Bankers-Fulbright, J. L., Kalli, K. R. and McKean, D. J. (1996). Interleukin-1 signal transduction. *Life Sci*, 59(2), 61-83.
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A. and van't Veer, M. B. (1995). Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*, 9(10), 1783-1786.

- Beziat, V., Dalgard, O., Asselah, T., Halfon, P., Bedossa, P., Boudifa, A., Hervier, B., Theodorou, I., Martinot, M., Debre, P., Bjorkstrom, N. K., Malmberg, K. J., Marcellin, P. and Vieillard, V. (2012). CMV drives clonal expansion of NKG2C+ NK cells expressing self-specific KIRs in chronic hepatitis patients. *Eur J Immunol*, 42(2), 447-457.
- Beziat, V., Liu, L. L., Malmberg, J. A., Ivarsson, M. A., Sohlberg, E., Bjorklund, A. T., Retiere, C., Sverre-remark-Ekstrom, E., Traherne, J., Ljungman, P., Schaffer, M., Price, D. A., Trowsdale, J., Michaelsson, J., Ljunggren, H. G. and Malmberg, K. J. (2013). NK cell responses to cytomegalovirus infection lead to stable imprints in the human KIR repertoire and involve activating KIRs. *Blood*, 121(14), 2678-2688.
- Binstadt, B. A., Brumbaugh, K. M., Dick, C. J., Scharenberg, A. M., Williams, B. L., Colonna, M., Lanier, L. L., Kinet, J. P., Abraham, R. T. and Leibson, P. J. (1996). Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity*, 5(6), 629-638.
- Bjorkstrom, N. K., Lindgren, T., Stoltz, M., Fauriat, C., Braun, M., Evander, M., Michaelsson, J., Malmberg, K. J., Klingstrom, J., Ahlm, C. and Ljunggren, H. G. (2011). Rapid expansion and long-term persistence of elevated NK cell numbers in humans infected with hantavirus. *J Exp Med*, 208(1), 13-21.
- Bjorkstrom, N. K., Riese, P., Heuts, F., Andersson, S., Fauriat, C., Ivarsson, M. A., Bjorklund, A. T., Flodstrom-Tullberg, M., Michaelsson, J., Rottenberg, M. E., Guzman, C. A., Ljunggren, H. G. and Malmberg, K. J. (2010). Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood*, 116(19), 3853-3864.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., Hershkovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodavsky, I., Bovin, N. V. and Porgador, A. (2004). Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by Nkp30 and Nkp46. *J Immunol*, 173(4), 2392-2401.
- Bossi, G. and Griffiths, G. M. (2005). CTL secretory lysosomes: biogenesis and secretion of a harmful organelle. *Semin Immunol*, 17(1), 87-94.
- Bottino, C., Castriconi, R., Moretta, L. and Moretta, A. (2005). Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol*, 26(4), 221-226.
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M. and Moretta, A. (2003). Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med*, 198(4), 557-567.
- Bratke, K., Kuepper, M., Bade, B., Virchow, J. C., Jr. and Luttmann, W. (2005). Differential expression of human granzymes A, B, and K in natural killer cells and during CD8+ T cell differentiation in peripheral blood. *Eur J Immunol*, 35(9), 2608-2616.

- Braud, V. M., Allan, D. S., O'Callaghan, C. A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G. S., Lazetic, S., Young, N. T., Bell, J. I., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and McMichael, A. J. (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature*, 391(6669), 795-799.
- Braumuller, H., Wieder, T., Brenner, E., Assmann, S., Hahn, M., Alkhaled, M., Schilbach, K., Essmann, F., Kneilling, M., Griessinger, C., Ranta, F., Ullrich, S., Mocikat, R., Braungart, K., Mehra, T., Fehrenbacher, B., Berdel, J., Niessner, H., Meier, F., van den Broek, M., Haring, H. U., Handgretinger, R., Quintanilla-Martinez, L., Fend, F., Pesic, M., Bauer, J., Zender, L., Schaller, M., Schulze-Osthoff, K. and Rocken, M. (2013). T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. *Nature*, 494(7437), 361-365.
- Brown, M. H., Boles, K., van der Merwe, P. A., Kumar, V., Mathew, P. A. and Barclay, A. N. (1998). 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J Exp Med*, 188(11), 2083-2090.
- Brunetta, E., Fogli, M., Varchetta, S., Bozzo, L., Hudspeth, K. L., Marcenaro, E., Moretta, A. and Mavilio, D. (2010). Chronic HIV-1 viremia reverses NKG2A/NKG2C ratio on natural killer cells in patients with human cytomegalovirus co-infection. *AIDS*, 24(1), 27-34.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Barber, D. F., Ljunggren, H. G. and Long, E. O. (2005). Cytolytic granule polarization and degranulation controlled by different receptors in resting NK cells. *J Exp Med*, 202(7), 1001-1012.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O. (2006). Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev*, 214, 73-91.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood*, 107(1), 159-166.
- Bubic, I., Wagner, M., Krmptotic, A., Saulig, T., Kim, S., Yokoyama, W. M., Jonjic, S. and Koszinowski, U. H. (2004). Gain of virulence caused by loss of a gene in murine cytomegalovirus. *J Virol*, 78(14), 7536-7544.
- Burns, L. J., Weisdorf, D. J., DeFor, T. E., Vesole, D. H., Repka, T. L., Blazar, B. R., Burger, S. R., Panoskaltsis-Mortari, A., Keever-Taylor, C. A., Zhang, M. J. and Miller, J. S. (2003). IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transplant*, 32(2), 177-186.
- Burshtyn, D. N., Scharenberg, A. M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J. P. and Long, E. O. (1996). Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity*, 4(1), 77-85.
- Caligiuri, M. A. (2008). Human natural killer cells. *Blood*, 112(3), 461-469.

- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A. and Biassoni, R. (1999). NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med*, 189(5), 787-796.
- Cella, M., Longo, A., Ferrara, G. B., Strominger, J. L. and Colonna, M. (1994). NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80. *J Exp Med*, 180(4), 1235-1242.
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2016). Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol*, 16(2), 112-123.
- Chauveau, A., Aucher, A., Eissmann, P., Vivier, E. and Davis, D. M. (2010). Membrane nanotubes facilitate long-distance interactions between natural killer cells and target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(12), 5545-5550.
- Chen, R., Relouzat, F., Roncagalli, R., Aoukaty, A., Tan, R., Latour, S. and Veillette, A. (2004). Molecular dissection of 2B4 signaling: implications for signal transduction by SLAM-related receptors. *Mol Cell Biol*, 24(12), 5144-5156.
- Chiaretti, S. and Foa, R. (2009). T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 94(2), 160-162.
- Choi, P. J. and Mitchison, T. J. (2013). Imaging burst kinetics and spatial coordination during serial killing by single natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(16), 6488-6493.
- Colonna, M., Borsellino, G., Falco, M., Ferrara, G. B. and Strominger, J. L. (1993). HLA-C is the inhibitory ligand that determines dominant resistance to lysis by NK1- and NK2-specific natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24), 12000-12004.
- Colucci, F., Caligiuri, M. A. and Di Santo, J. P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews Immunology*, 3(5), 413-425.
- Comerci, C. J., Mace, E. M., Banerjee, P. P. and Orange, J. S. (2012). CD2 promotes human natural killer cell membrane nanotube formation. *PLoS One*, 7(10), e47664.
- Cooper, M. A., Elliott, J. M., Keyel, P. A., Yang, L., Carrero, J. A. and Yokoyama, W. M. (2009). Cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(6), 1915-1919.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22(11), 633-640.

- Coudert, J. D., Scarpellino, L., Gros, F., Vivier, E. and Held, W. (2008). Sustained NKG2D engagement induces cross-tolerance of multiple distinct NK cell activation pathways. *Blood*, 111(7), 3571-3578.
- Croston, G. E., Cao, Z. and Goeddel, D. V. (1995). NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J Biol Chem*, 270(28), 16514-16517.
- Crowe, N. Y., Smyth, M. J. and Godfrey, D. I. (2002). A critical role for natural killer T cells in immunosurveillance of methylcholanthrene-induced sarcomas. *J Exp Med*, 196(1), 119-127.
- Daniels, K. A., Devora, G., Lai, W. C., O'Donnell, C. L., Bennett, M. and Welsh, R. M. (2001). Murine cytomegalovirus is regulated by a discrete subset of natural killer cells reactive with monoclonal antibody to Ly49H. *J Exp Med*, 194(1), 29-44.
- Della Chiesa, M., Falco, M., Podesta, M., Locatelli, F., Moretta, L., Frassoni, F. and Moretta, A. (2012). Phenotypic and functional heterogeneity of human NK cells developing after umbilical cord blood transplantation: a role for human cytomegalovirus? *Blood*, 119(2), 399-410.
- Diefenbach, A. and Raulet, D. H. (2001). Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol Rev*, 181, 170-184.
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E. and Raulet, D. H. (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol*, 3(12), 1142-1149.
- DiSanto, J. P., Keever, C. A., Small, T. N., Nicols, G. L., O'Reilly, R. J. and Flomenberg, N. (1990). Absence of interleukin 2 production in a severe combined immunodeficiency disease syndrome with T cells. *J Exp Med*, 171(5), 1697-1704.
- Dokun, A. O., Kim, S., Smith, H. R., Kang, H. S., Chu, D. T. and Yokoyama, W. M. (2001). Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection. *Nat Immunol*, 2(10), 951-956.
- Eissmann, P., Beauchamp, L., Wooters, J., Tilton, J. C., Long, E. O. and Watzl, C. (2005). Molecular basis for positive and negative signaling by the natural killer cell receptor 2B4 (CD244). *Blood*, 105(12), 4722-4729.
- Fehniger, T. A., Cai, S. F., Cao, X., Bredemeyer, A. J., Presti, R. M., French, A. R. and Ley, T. J. (2007). Acquisition of murine NK cell cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity*, 26(6), 798-811.
- Fehniger, T. A., Stuart, R. K., Cooley, S. A., Miller, J. S., Curtsinger, J., Hillman, T. M., Silver, N., Szarek, M., Lowdell, M. W., Gorelik, L. and Rowinsky, E. (2014). Preliminary Results of a Phase 1/2 Clinical Trial of Cnd0-109-Activated Allogeneic Natural Killer Cells in High Risk Acute Myelogenous Leukemia Patients in First Complete Remission. *Blood*, 124(21).

- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S. and Raulet, D. H. (2005). A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood*, 105(11), 4416-4423.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Curtsinger, J., Luo, X., Waller, E. K., Anasetti, C., Weisdorf, D. and Miller, J. S. (2012). Human cytomegalovirus (CMV)-induced memory-like NKG2C(+) NK cells are transplantable and expand in vivo in response to recipient CMV antigen. *J Immunol*, 189(10), 5082-5088.
- Foley, B., Cooley, S., Verneris, M. R., Pitt, M., Curtsinger, J., Luo, X., Lopez-Verges, S., Lanier, L. L., Weisdorf, D. and Miller, J. S. (2012). Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function. *Blood*, 119(11), 2665-2674.
- Fossiez, F., Djossou, O., Chomarat, P., Flores-Romo, L., Ait-Yahia, S., Maat, C., Pin, J. J., Garrone, P., Garcia, E., Saeland, S., Blanchard, D., Gaillard, C., Das Mahapatra, B., Rouvier, E., Golstein, P., Banchereau, J. and Lebecque, S. (1996). T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines. *J Exp Med*, 183(6), 2593-2603.
- Freireich, E. J., Wiernik, P. H. and Steensma, D. P. (2014). The leukemias: a half-century of discovery. *J Clin Oncol*, 32(31), 3463-3469.
- Freud, A. G. and Caligiuri, M. A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunological Reviews*, 214, 56-72.
- Freud, A. G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M. T., Mao, H. C., Ferketich, A. K. and Caligiuri, M. A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med*, 203(4), 1033-1043.
- Fujisaki, H., Kakuda, H., Shimasaki, N., Imai, C., Ma, J., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W. H. and Campana, D. (2009). Expansion of highly cytotoxic human natural killer cells for cancer cell therapy. *Cancer Res*, 69(9), 4010-4017.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M. and Stern, P. L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today*, 18(2), 89-95.
- Gehrmann, M., Schmetzer, H., Eissner, G., Haferlach, T., Hiddemann, W. and Multhoff, G. (2003). Membrane-bound heat shock protein 70 (Hsp70) in acute myeloid leukemia: a tumor specific recognition structure for the cytolytic activity of autologous NK cells. *Haematologica*, 88(4), 474-476.

- Gersuk, G. M., Westermark, B., Mohabeer, A. J., Challita, P. M., Pattamakom, S. and Pattengale, P. K. (1991). Inhibition of human natural killer cell activity by platelet-derived growth factor (PDGF). III. Membrane binding studies and differential biological effect of recombinant PDGF isoforms. *Scand J Immunol*, 33(5), 521-532.
- Gillard, G. O., Bivas-Benita, M., Hovav, A. H., Grandpre, L. E., Panas, M. W., Seaman, M. S., Haynes, B. F. and Letvin, N. L. (2011). Thy1+ NK [corrected] cells from vaccinia virus-primed mice confer protection against vaccinia virus challenge in the absence of adaptive lymphocytes. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002141.
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E. and Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science*, 294(5542), 605-609.
- Gismondi, A., Jacobelli, J., Mainiero, F., Paolini, R., Piccoli, M., Frati, L. and Santoni, A. (2000). Cutting edge: functional role for proline-rich tyrosine kinase 2 in NK cell-mediated natural cytotoxicity. *J Immunol*, 164(5), 2272-2276.
- Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M. L., Ohlen, C., Orn, A. and Karre, K. (2000). Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype: An adaptive component of NK cell-mediated responses. *Journal of Experimental Medicine*, 191(1), 129-138.
- Grayson, J. M., Zajac, A. J., Altman, J. D. and Ahmed, R. (2000). Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol*, 164(8), 3950-3954.
- Grossman, W. J., Verbsky, J. W., Tollefsen, B. L., Kemper, C., Atkinson, J. P. and Ley, T. J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), 2840-2848.
- Guma, M., Angulo, A., Vilches, C., Gomez-Lozano, N., Malats, N. and Lopez-Botet, M. (2004). Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood*, 104(12), 3664-3671.
- Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A. and Lopez-Botet, M. (2006). Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts. *Blood*, 107(9), 3624-3631.
- Gumperz, J. E., Litwin, V., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Parham, P. (1995). The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor. *J Exp Med*, 181(3), 1133-1144.
- Handgretinger, R., Lang, P. and Andre, M. C. (2016). Exploitation of Natural Killer (NK) cells for the treatment of acute leukemia. *Blood*.

- Harrison, C. J. (2009). Cytogenetics of paediatric and adolescent acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*, 144(2), 147-156.
- Heldin, C. H. (1992). Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J*, 11(12), 4251-4259.
- Herberman, R. B., Nunn, M. E. and Lavrin, D. H. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer*, 16(2), 216-229.
- Hildeman, D. A., Zhu, Y., Mitchell, T. C., Bouillet, P., Strasser, A., Kappler, J. and Marrack, P. (2002). Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl-2 family member bim. *Immunity*, 16(6), 759-767.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2013, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/, based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016.
- Hsu, K. C., Liu, X. R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R. J. and Dupont, B. (2002). Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. *J Immunol*, 169(9), 5118-5129.
- Hunger, S. P. and Mullighan, C. G. (2015). Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. *N Engl J Med*, 373(16), 1541-1552.
- Hunger, S. P. and Mullighan, C. G. (2015). Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*, 125(26), 3977-3987.
- Huntington, N. D., Vosshenrich, C. A. and Di Santo, J. P. (2007). Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. *Nat Rev Immunol*, 7(9), 703-714.
- Imai, C., Iwamoto, S. and Campana, D. (2005). Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood*, 106(1), 376-383.
- Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K. W. and Schmidt, R. E. (2001). CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, 31(10), 3121-3127.

- James, A. M., Hsu, H. T., Dongre, P., Uzel, G., Mace, E. M., Banerjee, P. P. and Orange, J. S. (2013). Rapid activation receptor- or IL-2-induced lytic granule convergence in human natural killer cells requires Src, but not downstream signaling. *Blood*, 121(14), 2627-2637.
- Johnsen, A. C., Haux, J., Steinkjer, B., Nonstad, U., Egeberg, K., Sundan, A., Ashkenazi, A. and Espevik, T. (1999). Regulation of APO-2 ligand/trail expression in NK cells-involvement in NK cell-mediated cytotoxicity. *Cytokine*, 11(9), 664-672.
- Kaifu, T., Escaliere, B., Gastinel, L. N., Vivier, E. and Baratin, M. (2011). B7-H6/NKp30 interaction: a mechanism of alerting NK cells against tumors. *Cell Mol Life Sci*, 68(21), 3531-3539.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S. and Peschon, J. J. (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*, 191(5), 771-780.
- Keppel, M. P., Yang, L. and Cooper, M. A. (2013). Murine NK cell intrinsic cytokine-induced memory-like responses are maintained following homeostatic proliferation. *J Immunol*, 190(9), 4754-4762.
- Kiessling, R., Klein, E. and Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5(2), 112-117.
- Kim, S., Poursine-Laurent, J., Truscott, S. M., Lybarger, L., Song, Y. J., Yang, L., French, A. R., Sunwoo, J. B., Lemieux, S., Hansen, T. H. and Yokoyama, W. M. (2005). Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature*, 436(7051), 709-713.
- Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91(5), 661-672.
- Krahenbuhl and Tschopp, J. (1991). Perforin-Induced Pore Formation - Comment. *Immunology Today*, 12(11), 402-402.
- Krebs, P., Barnes, M. J., Lampe, K., Whitley, K., Bahjat, K. S., Beutler, B., Janssen, E. and Hoebe, K. (2009). NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood*, 113(26), 6593-6602.
- Kress, H., Stelzer, E. H., Holzer, D., Buss, F., Griffiths, G. and Rohrbach, A. (2007). Filopodia act as phagocytic tentacles and pull with discrete steps and a load-dependent velocity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(28), 11633-11638.
- Krzewski, K., Chen, X. and Strominger, J. L. (2008). WIP is essential for lytic granule polarization and NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7), 2568-2573.

- Krzewski, K., Gil-Krzewska, A., Nguyen, V., Peruzzi, G. and Coligan, J. E. (2013). LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*, 121(23), 4672-4683.
- Kundig, T. M., Schorle, H., Bachmann, M. F., Hengartner, H., Zinkernagel, R. M. and Horak, I. (1993). Immune responses in interleukin-2-deficient mice. *Science*, 262(5136), 1059-1061.
- Lanier, L. L. (1998). NK cell receptors. *Annu Rev Immunol*, 16, 359-393.
- Lanier, L. L. (2005). NK cell recognition. *Annu Rev Immunol*, 23, 225-274.
- Lee, J., Zhang, T., Hwang, I., Kim, A., Nitschke, L., Kim, M., Scott, J. M., Kamimura, Y., Lanier, L. L. and Kim, S. (2015). Epigenetic modification and antibody-dependent expansion of memory-like NK cells in human cytomegalovirus-infected individuals. *Immunity*, 42(3), 431-442.
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., Lopez-Botet, M. and Geraghty, D. E. (1998). HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(9), 5199-5204.
- Lee, S. H., Fragoso, M. F. and Biron, C. A. (2012). Cutting edge: a novel mechanism bridging innate and adaptive immunity: IL-12 induction of CD25 to form high-affinity IL-2 receptors on NK cells. *J Immunol*, 189(6), 2712-2716.
- Lee, S. H., Miyagi, T. and Biron, C. A. (2007). Keeping NK cells in highly regulated antiviral warfare. *Trends Immunol*, 28(6), 252-259.
- Leong, J. W., Chase, J. M., Romee, R., Schneider, S. E., Sullivan, R. P., Cooper, M. A. and Fehniger, T. A. (2014). Preactivation with IL-12, IL-15, and IL-18 induces CD25 and a functional high-affinity IL-2 receptor on human cytokine-induced memory-like natural killer cells. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20(4), 463-473.
- Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today*, 11(7), 237-244.
- Long, E. O. (1999). Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol*, 17, 875-904.
- Lopez-Verges, S., Milush, J. M., Schwartz, B. S., Pando, M. J., Jarjoura, J., York, V. A., Houchins, J. P., Miller, S., Kang, S. M., Norris, P. J., Nixon, D. F. and Lanier, L. L. (2011). Expansion of a unique CD57(+)NKG2Chi natural killer cell subset during acute human cytomegalovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(36), 14725-14732.

- Luetke-Eversloh, M., Hammer, Q., Durek, P., Nordstrom, K., Gasparoni, G., Pink, M., Hamann, A., Walter, J., Chang, H. D., Dong, J. and Romagnani, C. (2014). Human cytomegalovirus drives epigenetic imprinting of the IFNG locus in NKG2Chi natural killer cells. *PLoS Pathog*, 10(10), e1004441.
- Ma, X., Edmonson, M., Yergeau, D., Muzny, D. M., Hampton, O. A., Rusch, M., Song, G., Easton, J., Harvey, R. C., Wheeler, D. A., Ma, J., Doddapaneni, H., Vadodaria, B., Wu, G., Nagahawatte, P., Carroll, W. L., Chen, I. M., Gastier-Foster, J. M., Relling, M. V., Smith, M. A., Devidas, M., Guidry Auvil, J. M., Downing, J. R., Loh, M. L., Willman, C. L., Gerhard, D. S., Mullighan, C. G., Hunger, S. P. and Zhang, J. (2015). Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*, 6, 6604.
- Mace, E. M., Dongre, P., Hsu, H. T., Sinha, P., James, A. M., Mann, S. S., Forbes, L. R., Watkin, L. B. and Orange, J. S. (2014). Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol Cell Biol*, 92(3), 245-255.
- Madera, S. and Sun, J. C. (2015). Cutting edge: stage-specific requirement of IL-18 for antiviral NK cell expansion. *J Immunol*, 194(4), 1408-1412.
- Majewska-Szczepanik, M., Paust, S., von Andrian, U. H., Askenase, P. W. and Szczepanik, M. (2013). Natural killer cell-mediated contact sensitivity develops rapidly and depends on interferon-alpha, interferon-gamma and interleukin-12. *Immunology*, 140(1), 98-110.
- Majewska-Szczepanik, M., Strzepa, A., Drozynska, I., Motyl, S., Banach, T. and Szczepanik, M. (2012). Epicutaneous immunization with hapten-conjugated protein antigen alleviates contact sensitivity mediated by three different types of effector cells. *Pharmacol Rep*, 64(4), 919-926.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W. and Porgador, A. (2001). Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*, 409(6823), 1055-1060.
- Marcus, A., Gowen, B. G., Thompson, T. W., Iannello, A., Ardolino, M., Deng, W., Wang, L., Shifrin, N. and Raulet, D. H. (2014). Recognition of tumors by the innate immune system and natural killer cells. *Adv Immunol*, 122, 91-128.
- Marcus, A. and Raulet, D. H. (2013). Evidence for natural killer cell memory. *Curr Biol*, 23(17), R817-820.
- Marsh, S. G., Parham, P., Dupont, B., Geraghty, D. E., Trowsdale, J., Middleton, D., Vilches, C., Carrington, M., Witt, C., Guethlein, L. A., Shilling, H., Garcia, C. A., Hsu, K. C. and Wain, H. (2003). Killer-cell immunoglobulin-like receptor (KIR) nomenclature report, 2002. *Eur J Immunogenet*, 30(3), 229-234.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2004). Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol*, 5(12), 1260-1265.

- McGregor, S., McNeer, J. and Gurbuxani, S. (2012). Beyond the 2008 World Health Organization classification: the role of the hematopathology laboratory in the diagnosis and management of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Diagn Pathol*, 29(1), 2-11.
- McVicar, D. W., Taylor, L. S., Gosselin, P., Willette-Brown, J., Mikhael, A. I., Geahlen, R. L., Nakamura, M. C., Linnemeyer, P., Seaman, W. E., Anderson, S. K., Ortaldo, J. R. and Mason, L. H. (1998). DAP12-mediated signal transduction in natural killer cells. A dominant role for the Syk protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 273(49), 32934-32942.
- Meller, S., Di Domizio, J., Voo, K. S., Friedrich, H. C., Chamilos, G., Ganguly, D., Conrad, C., Gregorio, J., Le Roy, D., Roger, T., Ladbury, J. E., Homey, B., Watowich, S., Modlin, R. L., Kontoyiannis, D. P., Liu, Y. J., Arold, S. T. and Gilliet, M. (2015). T(H)17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat Immunol*, 16(9), 970-979.
- Menard, C., Blay, J. Y., Borg, C., Michiels, S., Ghiringhelli, F., Robert, C., Nonn, C., Chaput, N., Taieb, J., Delahaye, N. F., Flament, C., Emile, J. F., Le Cesne, A. and Zitvogel, L. (2009). Natural killer cell IFN-gamma levels predict long-term survival with imatinib mesylate therapy in gastrointestinal stromal tumor-bearing patients. *Cancer Res*, 69(8), 3563-3569.
- Mentlik, A. N., Sanborn, K. B., Holzbaur, E. L. and Orange, J. S. (2010). Rapid lytic granule convergence to the MTOC in natural killer cells is dependent on dynein but not cytolytic commitment. *Mol Biol Cell*, 21(13), 2241-2256.
- Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Groger, D., Park, T. S., Emerenciano, M., Pombo de Oliveira, M., Renneville, A., Villarese, P., Macintyre, E., Cave, H., Clappier, E., Mass-Malo, K., Zuna, J., Trka, J., De Braekeleer, E., De Braekeleer, M., Oh, S. H., Tsauro, G., Fechina, L., van der Velden, V. H., van Dongen, J. J., Delabesse, E., Binato, R., Silva, M. L., Kustanovich, A., Aleinikova, O., Harris, M. H., Lund-Aho, T., Juvonen, V., Heidenreich, O., Vormoor, J., Choi, W. W., Jarosova, M., Kolenova, A., Bueno, C., Menendez, P., Wehner, S., Eckert, C., Talmant, P., Tondeur, S., Lippert, E., Launay, E., Henry, C., Ballerini, P., Lapillone, H., Callanan, M. B., Cayuela, J. M., Herbaux, C., Cazzaniga, G., Kakadiya, P. M., Bohlander, S., Ahlmann, M., Choi, J. R., Gameiro, P., Lee, D. S., Krauter, J., Cornillet-Lefebvre, P., Te Kronnie, G., Schafer, B. W., Kubetzko, S., Alonso, C. N., zur Stadt, U., Sutton, R., Venn, N. C., Izraeli, S., Trakhtenbrot, L., Madsen, H. O., Archer, P., Hancock, J., Cerveira, N., Teixeira, M. R., Lo Nigro, L., Moricke, A., Stanulla, M., Schrappe, M., Sedek, L., Szczepanski, T., Zwaan, C. M., Coenen, E. A., van den Heuvel-Eibrink, M. M., Strehl, S., Dworzak, M., Panzer-Grumayer, R., Dingermann, T., Klingebiel, T. and Marschalek, R. (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia*, 27(11), 2165-2176.
- Miller, J. S. and 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. *Blood*, 98(3), 705-713.

- Miller, J. S., Soignier, Y., Panoskaltis-Mortari, A., McNearney, S. A., Yun, G. H., Fautsch, S. K., McKenna, D., Le, C., Defor, T. E., Burns, L. J., Orchard, P. J., Blazar, B. R., Wagner, J. E., Slungaard, A., Weisdorf, D. J., Okazaki, I. J. and McGlave, P. B. (2005). Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood*, 105(8), 3051-3057.
- Min-Oo, G., Bezman, N. A., Madera, S., Sun, J. C. and Lanier, L. L. (2014). Proapoptotic Bim regulates antigen-specific NK cell contraction and the generation of the memory NK cell pool after cytomegalovirus infection. *J Exp Med*, 211(7), 1289-1296.
- Moretta, A., Bottino, C., Pende, D., Tripodi, G., Tambussi, G., Viale, O., Orengo, A., Barbaresi, M., Merli, A., Ciccone, E. and et al. (1990). Identification of four subsets of human CD3-CD16+ natural killer (NK) cells by the expression of clonally distributed functional surface molecules: correlation between subset assignment of NK clones and ability to mediate specific alloantigen recognition. *J Exp Med*, 172(6), 1589-1598.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C. and Moretta, L. (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol*, 14, 619-648.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, L. (2001). Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol*, 19, 197-223.
- Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M. and Moretta, L. (2005). Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues. *Trends Immunol*, 26(12), 668-675.
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C. and Moretta, L. (1995). Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells. *J Exp Med*, 182(3), 875-884.
- Moretta, L., Ciccone, E., Pende, D., Viale, O., Di Donato, C., Tripodi, G., Orengo, A. M., Guardiola, J. and Moretta, A. (1992). Existence of a natural killer (NK) cell repertoire for (allo)antigen recognition: definition of five distinct NK-determined allospecificities in humans. *Pharmacol Res*, 26 Suppl 2, 98-99.
- Moricke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., Ludwig, W. D., Ritter, J., Harbott, J., Mann, G., Klingebiel, T., Zintl, F., Niemeyer, C., Kremens, B., Niggli, F., Niethammer, D., Welte, K., Stanulla, M., Odenwald, E., Riehm, H. and Schrappe, M. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*, 24(2), 265-284.
- Nabekura, T., Girard, J. P. and Lanier, L. L. (2015). IL-33 Receptor ST2 Amplifies the Expansion of NK Cells and Enhances Host Defense during Mouse Cytomegalovirus Infection. *Journal of Immunology*, 194(12), 5948-5952.

- Nabekura, T., Kanaya, M., Shibuya, A., Fu, G., Gascoigne, N. R. and Lanier, L. L. (2014). Costimulatory molecule DNAM-1 is essential for optimal differentiation of memory natural killer cells during mouse cytomegalovirus infection. *Immunity*, 40(2), 225-234.
- Nachman, J. B., Heerema, N. A., Sather, H., Camitta, B., Forestier, E., Harrison, C. J., Dastugue, N., Schrappe, M., Pui, C. H., Basso, G., Silverman, L. B. and Janka-Schaub, G. E. (2007). Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 110(4), 1112-1115.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell*, 88(3), 355-365.
- Nakata, M., Kawasaki, A., Azuma, M., Tsuji, K., Matsuda, H., Shinkai, Y., Yagita, H. and Okumura, K. (1992). Expression of perforin and cytolytic potential of human peripheral blood lymphocyte subpopulations. *Int Immunol*, 4(9), 1049-1054.
- Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N. and Cerwenka, A. (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med*, 209(13), 2351-2365.
- North, J., Bakhsh, I., Marden, C., Pittman, H., Addison, E., Navarrete, C., Anderson, R. and Lowdell, M. W. (2007). Tumor-primed human natural killer cells lyse NK-resistant tumor targets: evidence of a two-stage process in resting NK cell activation. *J Immunol*, 178(1), 85-94.
- O'Leary, J. G., Goodarzi, M., Drayton, D. L. and von Andrian, U. H. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol*, 7(5), 507-516.
- Ogbomo, H., Michaelis, M., Kreuter, J., Doerr, H. W. and Cinatl, J., Jr. (2007). Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity. *FEBS Lett*, 581(7), 1317-1322.
- Olcese, L., Lang, P., Vely, F., Cambiaggi, A., Marguet, D., Blery, M., Hippen, K. L., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., Cambier, J. C. and Vivier, E. (1996). Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol*, 156(12), 4531-4534.
- Oppenheim, D. E., Roberts, S. J., Clarke, S. L., Filler, R., Lewis, J. M., Tigelaar, R. E., Girardi, M. and Hayday, A. C. (2005). Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*, 6(9), 928-937.
- Orange, J. S., Harris, K. E., Andzelm, M. M., Valter, M. M., Geha, R. S. and Strominger, J. L. (2003). The mature activating natural killer cell immunologic synapse is formed in distinct stages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14151-14156.

- Orange, J. S., Ramesh, N., Remold-O'Donnell, E., Sasahara, Y., Koopman, L., Byrne, M., Bonilla, F. A., Rosen, F. S., Geha, R. S. and Strominger, J. L. (2002). Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(17), 11351-11356.
- Ortaldo, J. R., Winkler-Pickett, R. T., Nagata, S. and Ware, C. F. (1997). Fas involvement in human NK cell apoptosis: lack of a requirement for CD16-mediated events. *J Leukoc Biol*, 61(2), 209-215.
- Parham, P. (2005). MHC class I molecules and KIRs in human history, health and survival. *Nat Rev Immunol*, 5(3), 201-214.
- Paust, S., Gill, H. S., Wang, B. Z., Flynn, M. P., Moseman, E. A., Senman, B., Szczepanik, M., Telenti, A., Askenase, P. W., Compans, R. W. and von Andrian, U. H. (2010). Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses. *Nat Immunol*, 11(12), 1127-1135.
- Pellegrini, M., Belz, G., Bouillet, P. and Strasser, A. (2003). Shutdown of an acute T cell immune response to viral infection is mediated by the proapoptotic Bcl-2 homology 3-only protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(24), 14175-14180.
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A. and Moretta, L. (1996). The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer. *J Exp Med*, 184(2), 505-518.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A. (1999). Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine*, 190(10), 1505-1516.
- Peng, H., Jiang, X., Chen, Y., Sojka, D. K., Wei, H., Gao, X., Sun, R., Yokoyama, W. M. and Tian, Z. (2013). Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J Clin Invest*, 123(4), 1444-1456.
- Peng, H. and Tian, Z. (2015). Re-examining the origin and function of liver-resident NK cells. *Trends Immunol*, 36(5), 293-299.
- Perussia, B. (1998). Fc receptors on natural killer cells. *Specificity, Function, and Development of Nk Cells*, 230, 63-88.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R. and Moretta, A. (1998). Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med*, 188(5), 953-960.

- Peter, M. E. and Krammer, P. H. (2003). The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*, 10(1), 26-35.
- Pfeiffer, M. M., Schumm, M., Muller, I., Handgretinger, R. and Lang, P. (2012). IL-15-stimulated CD3/CD19-depleted stem-cell boosts in relapsed pediatric patients after haploidentical SCT. *Leukemia*, 26(11), 2435-2439.
- Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M. and Engert, A. (2007). Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*, 27(6), 965-974.
- Polentarutti, N., Allavena, P., Bianchi, G., Giardino, G., Basile, A., Sozzani, S., Mantovani, A. and Introna, M. (1997). IL-2-regulated expression of the monocyte chemotactic protein-1 receptor (CCR2) in human NK cells: characterization of a predominant 3.4-kilobase transcript containing CCR2B and CCR2A sequences. *J Immunol*, 158(6), 2689-2694.
- Pui, C. H. and Evans, W. E. (2013). A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*, 50(3), 185-196.
- Pui, C. H., Robison, L. L. and Look, A. T. (2008). Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*, 371(9617), 1030-1043.
- Pyzik, M., Charbonneau, B., Gendron-Pontbriand, E. M., Babic, M., Krmptotic, A., Jonjic, S. and Vidal, S. M. (2011). Distinct MHC class I-dependent NK cell-activating receptors control cytomegalovirus infection in different mouse strains. *J Exp Med*, 208(5), 1105-1117.
- Ranson, T., Vosshenrich, C. A., Corcuff, E., Richard, O., Muller, W. and Di Santo, J. P. (2003). IL-15 is an essential mediator of peripheral NK-cell homeostasis. *Blood*, 101(12), 4887-4893.
- Raulet, D. H. and Guerra, N. (2009). Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*, 9(8), 568-580.
- Raulet, D. H. and Vance, R. E. (2006). Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol*, 6(7), 520-531.
- Raulet, D. H., Vance, R. E. and McMahon, C. W. (2001). Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu Rev Immunol*, 19, 291-330.
- Robbins, S. H., Bessou, G., Cornillon, A., Zucchini, N., Rupp, B., Ruzsics, Z., Sacher, T., Tomasello, E., Vivier, E., Koszinowski, U. H. and Dalod, M. (2007). Natural killer cells promote early CD8 T cell responses against cytomegalovirus. *PLoS Pathog*, 3(8), e123.

- Rolle, A., Pollmann, J., Ewen, E. M., Le, V. T., Halenius, A., Hengel, H. and Cerwenka, A. (2014). IL-12-producing monocytes and HLA-E control HCMV-driven NKG2C+ NK cell expansion. *J Clin Invest*, 124(12), 5305-5316.
- Romee, R., Leong, J. W. and Fehniger, T. A. (2014). Utilizing cytokines to function-enable human NK cells for the immunotherapy of cancer. *Scientifica (Cairo)*, 2014, 205796.
- Romee, R., Schneider, S. E., Leong, J. W., Chase, J. M., Keppel, C. R., Sullivan, R. P., Cooper, M. A. and Fehniger, T. A. (2012). Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*, 120(24), 4751-4760.
- Rubnitz, J. E., Inaba, H., Ribeiro, R. C., Pounds, S., Rooney, B., Bell, T., Pui, C. H. and Leung, W. (2010). NKAML: a pilot study to determine the safety and feasibility of haploidentical natural killer cell transplantation in childhood acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 28(6), 955-959.
- Ruggeri, L., Aversa, F., Martelli, M. F. and Velardi, A. (2006). Allogeneic hematopoietic transplantation and natural killer cell recognition of missing self. *Immunol Rev*, 214, 202-218.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R. S., Martelli, M. F. and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 94(1), 333-339.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W. D., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., Aversa, F., Martelli, M. F. and Velardi, A. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295(5562), 2097-2100.
- Rutz, S., Wang, X. and Ouyang, W. (2014). The IL-20 subfamily of cytokines--from host defence to tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol*, 14(12), 783-795.
- Sabry, M., Tsirogianni, M., Bakhsh, I. A., North, J., Sivakumaran, J., Giannopoulos, K., Anderson, R., Mackinnon, S. and Lowdell, M. W. (2011). Leukemic priming of resting NK cells is killer Ig-like receptor independent but requires CD15-mediated CD2 ligation and natural cytotoxicity receptors. *J Immunol*, 187(12), 6227-6234.
- Salcedo, T. W., Azzoni, L., Wolf, S. F. and Perussia, B. (1993). Modulation of perforin and granzyme messenger RNA expression in human natural killer cells. *J Immunol*, 151(5), 2511-2520.
- Salih, H. R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S. Z., Kanz, L., Rammensee, H. G. and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, 102(4), 1389-1396.
- Sarkar, S., Kalia, V., Haining, W. N., Konieczny, B. T., Subramaniam, S. and Ahmed, R. (2008). Functional and genomic profiling of effector CD8 T cell subsets with distinct memory fates. *J Exp Med*, 205(3), 625-640.

- Schlums, H., Cichocki, F., Tesi, B., Theorell, J., Beziat, V., Holmes, T. D., Han, H., Chiang, S. C., Foley, B., Mattsson, K., Larsson, S., Schaffer, M., Malmberg, K. J., Ljunggren, H. G., Miller, J. S. and Bryceson, Y. T. (2015). Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*, 42(3), 443-456.
- Schrapppe, M., Reiter, A., Zimmermann, M., Harbott, J., Ludwig, W. D., Henze, G., Gadner, H., Odenwald, E. and Riehm, H. (2000). Long-term results of four consecutive trials in childhood ALL performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 1995. Berlin-Frankfurt-Munster. *Leukemia*, 14(12), 2205-2222.
- Shi, L., Kam, C. M., Powers, J. C., Aebersold, R. and Greenberg, A. H. (1992). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med*, 176(6), 1521-1529.
- Shibuya, K., Lanier, L. L., Phillips, J. H., Ochs, H. D., Shimizu, K., Nakayama, E., Nakauchi, H. and Shibuya, A. (1999). Physical and functional association of LFA-1 with DNAM-1 adhesion molecule. *Immunity*, 11(5), 615-623.
- Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D. and Parham, P. (2002). Genetic control of human NK cell repertoire. *J Immunol*, 169(1), 239-247.
- Shlomchik, W. D., Couzens, M. S., Tang, C. B., McNiff, J., Robert, M. E., Liu, J., Shlomchik, M. J. and Emerson, S. G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, 285(5426), 412-415.
- Smith, M., Arthur, D., Camitta, B., Carroll, A. J., Crist, W., Gaynon, P., Gelber, R., Heerema, N., Korn, E. L., Link, M., Murphy, S., Pui, C. H., Pullen, J., Reamon, G., Sallan, S. E., Sather, H., Shuster, J., Simon, R., Trigg, M., Tubergen, D., Uckun, F. and Ungerleider, R. (1996). Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol*, 14(1), 18-24.
- Smyth, M. J., Hayakawa, Y., Takeda, K. and Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(11), 850-861.
- Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R. and Yagita, H. (2003). Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy. *Immunity*, 18(1), 1-6.
- Spaggiari, G. M., Carosio, R., Pende, D., Marcenaro, S., Rivera, P., Zocchi, M. R., Moretta, L. and Poggi, A. (2001). NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *Eur J Immunol*, 31(6), 1656-1665.
- Stacey, M. A., Marsden, M., Wang, E. C., Wilkinson, G. W. and Humphreys, I. R. (2011). IL-10 restricts activation-induced death of NK cells during acute murine cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 187(6), 2944-2952.

- Stark, S. and Watzl, C. (2006). 2B4 (CD244), NTB-A and CRACC (CS1) stimulate cytotoxicity but no proliferation in human NK cells. *Int Immunol*, 18(2), 241-247.
- Stetson, D. B., Mohrs, M., Reinhardt, R. L., Baron, J. L., Wang, Z. E., Gapin, L., Kronenberg, M. and Locksley, R. M. (2003). Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function. *J Exp Med*, 198(7), 1069-1076.
- Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F. A., Moretta, A., Sun, P. D., Ugolini, S. and Vivier, E. (2005). Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(37), 13224-13229.
- Sun, J. C., Beilke, J. N., Bezman, N. A. and Lanier, L. L. (2011). Homeostatic proliferation generates long-lived natural killer cells that respond against viral infection. *J Exp Med*, 208(2), 357-368.
- Sun, J. C., Beilke, J. N. and Lanier, L. L. (2009). Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature*, 457(7229), 557-561.
- Sun, J. C. and Lanier, L. L. (2011). NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8(+) T cells. *Nat Rev Immunol*, 11(10), 645-657.
- Sun, J. C., Lopez-Verges, S., Kim, C. C., DeRisi, J. L. and Lanier, L. L. (2011). NK cells and immune "memory". *J Immunol*, 186(4), 1891-1897.
- Sun, J. C., Ma, A. and Lanier, L. L. (2009). Cutting edge: IL-15-independent NK cell response to mouse cytomegalovirus infection. *J Immunol*, 183(5), 2911-2914.
- Sun, J. C., Madera, S., Bezman, N. A., Beilke, J. N., Kaplan, M. H. and Lanier, L. L. (2012). Proinflammatory cytokine signaling required for the generation of natural killer cell memory. *J Exp Med*, 209(5), 947-954.
- Sutherland, C. L., Chalupny, N. J., Schooley, K., VandenBos, T., Kubin, M. and Cosman, D. (2002). UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol*, 168(2), 671-679.
- Tonn, T., Schwabe, D., Klingemann, H. G., Becker, S., Esser, R., Koehl, U., Suttorp, M., Seifried, E., Ottmann, O. G. and Bug, G. (2013). Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy*, 15(12), 1563-1570.
- Trapani, J. A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol*, 2(12), REVIEWS3014.
- Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 735-747.

- Upshaw, J. L., Schoon, R. A., Dick, C. J., Billadeau, D. D. and Leibson, P. J. (2005). The isoforms of phospholipase C-gamma are differentially used by distinct human NK activating receptors. *J Immunol*, 175(1), 213-218.
- Vance, R. E., Kraft, J. R., Altman, J. D., Jensen, P. E. and Raulet, D. H. (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med*, 188(10), 1841-1848.
- Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., Harris, N. L., Le Beau, M. M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. and Bloomfield, C. D. (2009). The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, 114(5), 937-951.
- Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, Moretta and Moretta, L. (2002). NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol*, 23(9), 438-444.
- Vivier, E., Nunes, J. A. and Vely, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science*, 306(5701), 1517-1519.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. and Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science*, 331(6013), 44-49.
- Vujanovic, N. L., Nagashima, S., Herberman, R. B. and Whiteside, T. L. (1996). Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol*, 157(3), 1117-1126.
- Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Winter, C. C., Peruzzi, M. and Long, E. O. (1995). Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity*, 3(6), 801-809.
- Welte, S. A., Sinzger, C., Lutz, S. Z., Singh-Jasuja, H., Sampaio, K. L., Eknigk, U., Rammensee, H. G. and Steinle, A. (2003). Selective intracellular retention of virally induced NKG2D ligands by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *Eur J Immunol*, 33(1), 194-203.
- Wherry, E. J., Ha, S. J., Kaech, S. M., Haining, W. N., Sarkar, S., Kalia, V., Subramaniam, S., Blattman, J. N., Barber, D. L. and Ahmed, R. (2007). Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity*, 27(4), 670-684.
- Williams, M. A. and Bevan, M. J. (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol*, 25, 171-192.
- Woiterski, J., Ebinger, M., Witte, K. E., Goecke, B., Heininger, V., Philippek, M., Bonin, M., Schrauder, A., Rottgers, S., Herr, W., Lang, P., Handgretinger, R., Hartwig, U. F. and Andre, M. C. (2013). Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid

- leukemias into NOD/SCID/IL2R γ null mice reflects individual leukemogenicity and highly correlates with clinical outcome. *Int J Cancer*, 133(7), 1547-1556.
- Wolk, K., Kunz, S., Asadullah, K. and Sabat, R. (2002). Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol*, 168(11), 5397-5402.
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A. B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L. L. and Phillips, J. H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 285(5428), 730-732.
- Wulfing, C., Purdie, B., Klem, J. and Schatzle, J. D. (2003). Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(13), 7767-7772.
- You, W., Tang, Q., Zhang, C., Wu, J., Gu, C., Wu, Z. and Li, X. (2013). IL-26 promotes the proliferation and survival of human gastric cancer cells by regulating the balance of STAT1 and STAT3 activation. *PLoS One*, 8(5), e63588.
- Young, H. A. and Bream, J. H. (2007). IFN- γ : recent advances in understanding regulation of expression, biological functions, and clinical applications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 316, 97-117.
- Yu, C. R., Ortaldo, J. R., Curiel, R. E., Young, H. A., Anderson, S. K. and Gosselin, P. (1999). Role of a STAT binding site in the regulation of the human perforin promoter. *J Immunol*, 162(5), 2785-2790.
- Yu, J., Mao, H. C., Wei, M., Hughes, T., Zhang, J., Park, I. K., Liu, S., McClory, S., Marcucci, G., Trotta, R. and Caligiuri, M. A. (2010). CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56^{bright} and CD56^{dim} human NK-cell subsets. *Blood*, 115(2), 274-281.
- Yu, J. J. and Gaffen, S. L. (2008). Interleukin-17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptive immunity. *Front Biosci*, 13, 170-177.
- Zhang, J., Scordi, I., Smyth, M. J. and Lichtenheld, M. G. (1999). Interleukin 2 receptor signaling regulates the perforin gene through signal transducer and activator of transcription (Stat)5 activation of two enhancers. *J Exp Med*, 190(9), 1297-1308.
- Zhang, T., Scott, J. M., Hwang, I. and Kim, S. (2013). Cutting edge: antibody-dependent memory-like NK cells distinguished by Fc γ deficiency. *J Immunol*, 190(4), 1402-1406.
- Zhou, J., Zhang, J., Lichtenheld, M. G. and Meadows, G. G. (2002). A role for NF- κ B activation in perforin expression of NK cells upon IL-2 receptor signaling. *J Immunol*, 169(3), 1319-1325.

9. ANHANG

Tabelle 21: Hochregulierte Gene in TIML-NK-Zellen im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen

Gen	FC	ENSG ID	Beschreibung	p-Wert
IL26	3,72	ENSG00000090376	interleukin 26	0,04
ALDOC	2,29	ENSG00000109107	aldolase C, fructose-bisphosphate	0,05
MACC1	2,27	ENSG00000100365	metastasis associated in colon cancer 1	0,03
TOX2	1,69		TOX high mobility group box family member 2	0,01
CYP1B1	1,44	ENSG00000138061	cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	0,04
FES	1,36	ENSG00000048052	FES proto-oncogene, tyrosine kinase	0,02
DOK3	1,22	ENSG00000146094	docking protein 3	0,05
CCR2	1,20	ENSG00000121807	chemokine (C-C motif) receptor 2	0,05
HDAC9	1,07	ENSG00000180573	histone deacetylase 9	0,02
RHOBTB3	1,00	ENSG00000164808	Rho-related BTB domain containing 3	0,05
FAM26F	0,90	ENSG00000188820	family with sequence similarity 26, member F	0,03
CXCR6	0,87	ENSG00000172215	chemokine (C-X-C motif) receptor 6	0,02
NCF4	0,86	LRG_159	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	0,00
SPIR	0,81	ENSG00000007350	scaffolding protein involved in DNA repair	0,05
CEBPD	0,81	ENSG00000221869	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	0,00
FAM26F	0,80	ENSG00000182511	family with sequence similarity 26, member F	0,02
HIST1H2AC	0,76	ENSG00000158373	histone cluster 1, H2ac	0,04
IRAK3	0,75	ENSG00000183742	interleukin-1 receptor-associated kinase 3	0,04
TKTL1	0,74	ENSG00000124191	transketolase-like 1	0,00
CTSL	0,73	ENSG00000135047	cathepsin L	0,04
NCF4	0,73	ENSG00000164292	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	0,00
HIST1H2BD	0,69	ENSG00000177663	histone cluster 1, H2bd	0,03
IL17RA	0,65	LRG_355	interleukin 17 receptor A	0,04

Tabelle 22: Herunterregulierte Gene in TIML-NK-Zellen im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen

Gen	FC	ENSG ID	Beschreibung	p-Wert
MCC	-0,60	ENSG00000171444	mutated in colorectal cancers	0,04
SLC39A14	-0,62	ENSG00000104635	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	0,03
HIC1	-0,63	ENSG00000177374	hypermethylated in cancer 1	0,01
FAM92A1	-0,63	ENSG00000188343	family with sequence similarity 92, member A1	0,05
VDR	-0,66	ENSG00000111424	vitamin D (1,25- dihydroxyvitamin D3) receptor	0,01
GRASP	-0,66	ENSG00000161835	GRP1 (general receptor for phosphoinositides 1)-associated scaffold protein	0,00
AGMAT	-0,67	ENSG00000116771	agmatine ureohydrolase (agmatinase)	0,00
YBX3	-0,69	ENSG00000060138	Y box binding protein 3	0,01
DUSP4	-0,70	ENSG00000120875	dual specificity phosphatase 4	0,02
C18orf54	-0,71	ENSG00000166845	chromosome 18 open reading frame 54	0,00
SCD	-0,71	ENSG00000099194	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	0,04
POLR3K	-0,73	ENSG00000161980	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide K, 12.3 kDa	0,02
NIPA1	-0,77	ENSG00000170113	non imprinted in Prader-Willi/Angelman syndrome 1	0,00
CRNDE	-0,86	ENSG00000245694	colorectal neoplasia differentially expressed (non-protein coding)	0,01
FAM166B	-0,87	ENSG00000215187	family with sequence similarity 166, member B	0,00
C1orf53	-0,87	ENSG00000203724	chromosome 1 open reading frame 53	0,00
PTGIS	-1,16	ENSG00000124212	prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase	0,01
PDGFA	-1,52	ENSG00000197461	platelet-derived growth factor alpha polypeptide	0,03

Tabelle 23: Hochregulierte Gene in CIML-NK-Zellen im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen

Gen	FC	ENSG ID	Beschreibung	p-Wert
PACSLIN1	1,47	ENSG00000124507	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1	0,01
WIPF3	1,04	ENSG00000122574	WAS/WASL interacting protein family, member 3	0,02
IL1R1	0,98	ENSG00000115594	interleukin 1 receptor, type I	0,03
LTA	0,97	ENSG00000231408	lymphotoxin alpha	0,01
RRAD	0,95	ENSG00000166592	Ras-related associated with diabetes	0,03
SELL	0,93	ENSG00000188404	selectin L	0,01
TRIB1	0,92	ENSG00000173334	tribbles pseudokinase 1	0,01
FUT7	0,92	ENSG00000180549	fucosyltransferase 7 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	0,02
CCR7	0,88	ENSG00000126353	chemokine (C-C motif) receptor 7	0,03
P2RX5	0,81	ENSG00000083454	purinergic receptor P2X, ligand gated ion channel, 5	0,00
MYH3	0,72	ENSG00000109063	myosin, heavy chain 3, skeletal muscle, embryonic	0,04
DUSP16	0,71	ENSG00000111266	dual specificity phosphatase 16	0,02
HLA-DQB1	0,71	ENSG00000225824	major histocompatibility complex, class II, DQ beta 1	0,03
MAF	0,69	ENSG00000178573	v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog	0,03
ZNRF1	0,68	ENSG00000186187	zinc and ring finger 1, E3 ubiquitin protein ligase	0,02
NETO2	0,65	ENSG00000171208	neuropilin (NRP) and tolloid (TLL)-like 2	0,00
LINC01260	0,65	ENSG00000132832	long intergenic non-protein coding RNA 1260	0,05
FOSB	0,65	ENSG00000125740	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	0,02
IFRD1	0,64	ENSG00000006652	interferon-related developmental regulator 1	0,03
HLA-DPA1	0,64	ENSG00000229685	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	0,02
DIXDC1	0,64	ENSG00000150764	DIX domain containing 1	0,00
IL18RAP	0,63	ENSG00000115607	interleukin 18 receptor accessory protein	0,04
FES	0,61	ENSG00000182511	FES proto-oncogene, tyrosine kinase	0,00
PLXNA4	0,60	ENSG00000221866	plexin A4	0,03
HLA-DRA	0,59	ENSG00000204287	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	0,04
CITA	0,59		class II, major histocompatibility complex, transactivator	0,04
HS6ST2	0,59	ENSG00000171004	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	0,01

Tabelle 24: Herunterregulierte Gene in CIML-NK-Zellen im Vergleich zu Kontroll-NK-Zellen

Gen	FC	ENSG ID	Beschreibung	p-Wert
IGF2BP2	-0,59	ENSG00000073792	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 2	0,01
KIR2DL4	-0,59	ENSG00000276044	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	0,01
ARHGGEF39	-0,59	ENSG00000137135	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 39	0,02
SUOX	-0,60	ENSG00000139531	sulfite oxidase	0,03
RAB6A	-0,60	ENSG00000175582	RAB6A, member RAS oncogene family	0,05
FAM92A1	-0,60	ENSG00000188343	family with sequence similarity 92, member A1	0,02
CENPJ	-0,61	ENSG00000151849	centromere protein J	0,05
FHL1	-0,62	ENSG00000022267	four and a half LIM domains 1	0,00
MYEF2	-0,62	ENSG00000104177	myelin expression factor 2	0,01
ALDH6A1	-0,63	ENSG00000119711	aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	0,00
LDLR	-0,63	ENSG00000130164	low density lipoprotein receptor	0,02
SNTB1	-0,64	ENSG00000172164	syntrophin, beta 1 (dystrophin-associated protein A1, 59kDa, basic component 1)	0,03
RNF144A	-0,64	ENSG00000151692	ring finger protein 144A	0,02
NCF4	-0,65	ENSG00000100365	neutrophil cytosolic factor 4, 40kDa	0,03
WNT11	-0,66	ENSG00000085741	wingless-type MMTV integration site family, member 11	0,03
NCR2	-0,67	ENSG00000096264	natural cytotoxicity triggering receptor 2	0,00
TUBB6	-0,68	ENSG00000176014	tubulin, beta 6 class V	0,04
INCENP	-0,68	ENSG00000149503	inner centromere protein antigens 135/155kDa	0,04
GUCY1B3	-0,68	ENSG00000061918	guanylate cyclase 1, soluble, beta 3	0,04
SMIM3	-0,69	ENSG00000256235	small integral membrane protein 3	0,00
TGM5	-0,71	ENSG00000104055	transglutaminase 5	0,01
CENPI	-0,71	ENSG00000102384	centromere protein I	0,01
GPSM2	-0,71	ENSG00000121957	G-protein signaling modulator 2	0,03
FUCA1	-0,71	ENSG00000179163	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	0,01
NREP	-0,72	ENSG00000134986	neuronal regeneration related protein	0,03
ENPP3	-0,72	ENSG00000154269	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3	0,03
TRIQK	-0,73	ENSG00000205133	triple QxxK/R motif containing	0,01
SPC24	-0,77	ENSG00000161888	SPC24, NDC80 kinetochore complex component	0,03
KCNK5	-0,80	ENSG00000164626	potassium channel, two pore domain subfamily K, member 5	0,04
TOP2A	-0,80	ENSG00000131747	topoisomerase (DNA) II alpha 170kDa	0,04
GAS2L3	-0,82	ENSG00000139354	growth arrest-specific 2 like 3	0,03
FAM64A	-0,83	ENSG00000129195	family with sequence similarity 64, member A	0,05
MNS1	-0,89	ENSG00000138587	meiosis-specific nuclear structural 1	0,03
SLC12A8	-1,19	ENSG00000221955	solute carrier family 12, member 8	0,03
CDH17	-1,80	ENSG00000079112	cadherin 17, LI cadherin (liver-intestine)	0,01
DMRT1	-2,18	ENSG00000137090	doublesex and mab-3 related transcription factor 1	0,03

10. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

10.1 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (<i>Antibody dependent cellular cytotoxicity</i>)
AF	Alexa Fluor
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (<i>Activation induced cell death</i>)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin oder Antigenpräsentierende Zelle
ARD	Amin-reaktiver Farbstoff (<i>Amine reactive dye</i>)
AU	Willkürliche Einheit (<i>Arbitrary units</i>)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCP-	B-Zell Vorläufer- (<i>B cell precursor</i>)
BIM	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Rinderalbumin (<i>Bovine serum albumin</i>)
Buv	Brilliant Ultraviolett
Bv	Brilliant Violet
BZR	B-Zellrezeptor
bzw.	Beziehungsweise
Ca.	Ungefähr
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CCL2	CC-Chemokinligand 2 (<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>)
CD	Differenzierungsantigen (<i>Cluster of differentiation</i>)
cDNA	Zur Boten-RNA komplementäre (<i>Complementary</i>) DNA
CF	Cyanin basierter fluoreszenter Farbstoff
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetat- <i>N</i> -succinimidylester
CHS	Kontakt-Hypersensibilität (<i>Contact hypersensitivity</i>)
CIML	Zytokin-induziert Gedächtnis-ähnlich (<i>Cytokine induced memory-like</i>)
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalie-Virus
Cy	Cyacin-Farbstoff
cRNA	Biotinylierte RNA
CXCR	CXC-Chemokin-Rezeptor
dx	Tag <i>x</i>
dd	Bidestilliert
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zellen (<i>Dendritic cells</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNAM-1	<i>DNAX Accessory Molecule-1</i>
DNFB	Dinitrofluorbenzol
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EAT2	<i>Ewing's sarcoma-associated transcript 2</i>
E:T	Effektor-zu-Target-Verhältnis (<i>Effector cell to target cell ratio</i>)
EDTA	Di-Natriumethylenediaminetetraacetat
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FACS	Durchflusszytometer (<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>)
FC	Änderung x-fach (<i>Fold change</i>)
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum (<i>Fetal calf serum</i>)
FFP	Gefrorenes Frischplasma (<i>Fresh frozen plasma</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FMO	Durchflusszytometrischer Kontrollansatz (<i>Fluorescence minus one</i>)
FP	FACS Puffer
FSC	Vorwärts-Streulicht (<i>Forward scatter</i>)
g	Gravitationsfeldstärke oder Erdbeschleunigung
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>)
GMP	Gute Herstellungspraxis (<i>Good Manufacturing Practice</i>)
GO	Gen-Ontologie (<i>Gene ontology</i>)
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GvH	Transplantat gegen Wirt (<i>Graft versus host</i>)
GvHD	Transplantat gegen Wirt Erkrankung (<i>Graft versus host disease</i>)
GvL	Transplantat gegen Leukämie (<i>Graft versus leukemia</i>)
h	Human
HCMV	Humanes Cytomegalie-Virus
HDAC	Histon-Deacetylase
HF	Hellfeld
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HLA	Humane Leukozytenantigene
HSV	Herpes-simplex-Virus
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HuS	Humanserum
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILC	Angeborene lymphoide Zellen (<i>Innate lymphocyte cell</i>)
IRAK3	IL-1R-assoziierte Kinase 3
IS	Immunologische Synapse

ITSM	Immun-Tyrosin-basiertes Schaltermotiv (<i>Immunoreceptor tyrosine-based switch motif</i>)
ITAM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes aktivierendes Motiv (<i>Immunoreceptor tyrosin-based activating motif</i>)
ITIM	Immunrezeptor Tyrosin-enthaltendes inhibierendes Motiv (<i>Immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>)
i.v.	Intravenös
Kb	Kilobase (1000 Nukelotide)
KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (<i>Killer-cell immunoglobulin-like receptor</i>)
KIRL	KIR-Liganden
LAK	<i>Lymphokine-activated killer cell</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LCMV	Lymphocytic Choriomeningitis Virus
LFA-1	<i>Lymphocyte function-associated antigen 1</i>
m	Murin
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein (<i>Mitogen-activated protein</i>)
MCMV	Murines Cytomegalie-Virus
MedCF o. MFI	Mediane Fluoreszenzintensität (<i>Median channel fluorescence</i>)
MEM	Standardzellkulturmedium (<i>Minimum Essential Medium</i>)
MHC	Haupthistokompatibilitäts-Komplex (<i>Major histocompatibility complex</i>)
MICA/B	<i>MHC class I polypeptide-related sequence A/B</i>
MLL	<i>Mixed-lineage leukemia</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messengerRNA</i>)
MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum (<i>Microtubule organizing center</i>)
MW	Mittelwert
NCR	Natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (<i>Natural cytotoxicity receptor</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKAES	Expandierte NK-Zellen (<i>NK cell activation and expansion system</i>)
NOD	<i>Non-obese diabetic</i>
NS	NOD/ <i>scid</i>
NSG	NOD.Cg-Prkdc ^{scid} IL2rg ^{tmWjl} /SzJ
Pan	Alle
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PDGFA	<i>Platelet-Derived Growth Factor α</i>
PDGFR	PDGF-Rezeptor
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PFA	Paraformaldehyd
PI3	Phosphatidylinositol-3
PLZF	<i>Promyelocytic leukaemia zinc finger protein</i>

PVR	<i>Poliovirus receptor</i>
üN	über Nacht
Rag	<i>Recombination activating gene</i>
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
RPMI	Medium (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
RT	Raumtemperatur oder “ <i>Real-time</i> ”
SAP	SLAM-assoziiertes Protein (<i>SLAM-associated protein</i>)
SHP-1/2	<i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase-1/2</i>
SI	Internationales Einheitensystem
SIV	Simianes Immundefizienz-Virus
SLAM	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i>
Src, c-Src	<i>Cellular and sarcoma</i>
SSC	Seitwärts-Streulicht (<i>Side scatter</i>)
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
SYK	<i>Spleen tyrosine kinase</i>
Tab.	Tabelle
T-ANK	Tumor-aktivierte NK-Zelle (<i>Tumor-activated NK cell</i>)
TIML	Tumor-induziert Gedächtnis-ähnlich (<i>Tumor induced memory-like</i>)
TNF	Tumornekrosefaktor (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TZR	T-Zellrezeptor
q	Quantitativ
U	Internationale Einheit (IE) für medizinische Präparate anhand ihrer Wirkung
ULBP	UL16-Bindeproteine
VLP	Virusähnliches Partikel
VSV	<i>Vesicular stomatitis virus</i>
w/v	Massenprozent (<i>Weight per volume</i>)
z.B.	zum Beispiel
ZAP	<i>Zinc-Finger Antiviral Protein</i>

10.2 SI-Einheiten, SI-Präfixe und zum Gebrauch mit dem SI zugelassene Einheiten

Da	Dalton
Gy	Gray
h	Stunde(n)
Hz	Hertz
k	Kilo-
kg	Kilogramm
l	Liter
mol	Mol
m	Milli-
m	Meter
min	Minute
μ	Mikro-
n	Nano-
p	Pico-
s	Sekunde(n)
V	Volt
°C	Grad Celsius

10.3 Anglizismen

Begriffe, die aus dem Angelsächsischen stammen, häufig aber im deutschen Sprachgebrauch übernommen werden, werden in Kürze beschrieben, in der vorliegenden Arbeit jedoch in Ihrer ursprünglichen Form verwendet.

Assay	Ein standardisierter Reaktionsablauf zum Nachweis einer Substanz mit einer spezifischen Methode.
Cluster	Eine Gruppe von Genen, die zur gleichen Genfamilie gehören. Diese liegen in den meisten Fällen im Genom in nächster Nähe und sind dabei nur von nicht-codierender DNA voneinander getrennt.
Engraftment	Das Anwachsen transplantierte Zellen.
Memory (-like)	Das immunologische Gedächtnis/Gedächtnis-ähnlich. Eine Zelle zeigt nach einmaligem Kontakt eine erhöhte Reaktionsfähigkeit auf das betreffende Antigen.
Priming	Der Erstkontakt einer Zelle mit einem spezifischen Antigen, welcher zur Folge hat, dass Zellen bei einer zweiten oder späteren Immunantwort als Gedächtniszellen reagieren können.
Splitten	Vereinzelung und Umsetzung von Zellen aus einer Zellkultur, um die durch die Zellkontakthemmung erzeugte Verlangsamung der Zellteilungsrate zu vermeiden.
Target	Eine Zielzelle.

11. ERKLÄRUNG

Die Konzeption der Forschungsarbeit und die Interpretation der Daten erfolgte in Zusammenarbeit mit *Frau PD Dr. Dr. Maya Caroline André*, Leiterin der AG André an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

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

Die Transkriptomanalyse erfolgte an der Genomics und Proteomics Core Facility des DKFZ Heidelberg. Die Transkriptom-Rohdaten wurden von *Herrn PD Dr. Rainer Claus*, Universitätsklinikum Freiburg, aufbereitet.

Die quantitative RT-PCR wurde in der MFTServices Core Facility der Medizinischen Genetik, Universitätsklinikum Tübingen, durchgeführt.

Die konfokalen Aufnahmen und deren quantitative Analyse wurden von *Frau Emily Mace, PhD*, und *Frau Anastasiya Yermakova, PhD* aus dem Labor von *Herrn Prof. Jordan S. Orange, MD, PhD*, Baylor College of Medicine, Houston, Texas (USA) durchgeführt.

Frau Lisa Schwab führte im Rahmen ihrer Master-Thesis und unter meiner Anleitung Untersuchungen zur Zytotoxizität der TIML-NK-Zellen durch (4 Spender aus Abb. 6 B, 5 Spender aus Abb. 7 B, 2 Spender aus Abb. 9 C).

Die Viabilitätsassays wurde in Zusammenarbeit mit *Frau Ann-Christin Krahl* durchgeführt.

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

Die vorliegende Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen unter Betreuung von *Herrn Prof. Dr. Rupert Handgretinger* und *Herrn Prof. Dr. Dominik Hartl* durchgeführt.

12. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt:

PD Dr. Dr. Maya André für die Aufnahme in Ihre Arbeitsgruppe, die umfassende Betreuung und Ihre stetige Diskussionsbereitschaft, die für den Erfolg dieser Arbeit maßgeblich waren. Sie stand mir stets mit Rat und Tat zur Seite, was dank Ihres riesigen Erfahrungsschatzes und Ihrer offenen Art von unschätzbarem Wert war.

Prof. Dr. Rupert Handgretinger für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas und für die Bereitstellung des hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Prof. Dr. Dominik Hartl für die bereitwillige Übernahme der Berichterstattung.

Emily Mace, PhD, Anastasiya Smith, PhD und *PD Dr. Rainer Claus* für die außerordentliche gute Zusammenarbeit im Rahmen der bestehenden Kooperationen zwischen unseren Arbeitsgruppen.

PD Dr. Martin Ebinger und allen weiteren Beteiligten der „Blastenbank kindlicher Leukämien“ an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen.

Den *Kindern*, die Ihre Knochenmarkszellen zum Zeitpunkt Ihrer Leukämie-Diagnose der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen zu Forschungszwecken überlassen haben.

Allen Mitarbeitern, Doktoranden und Studenten der Abteilung Hämatologie/Onkologie in der Kinderklinik für ein überaus angenehmes, hilfsbereites und Blutspende-freundliches Arbeitsklima.

Jeanette Woiterski, Kathrin Stauß, Maximilian Rentschler und *Ayline Kübler* die mich zu Beginn meiner Promotion als „Neuling“ ausführlich in die zellbiologische und immunologische Methodik einführten.

Sarah Bühler für Ihre ausgezeichnete technische Unterstützung.

Sara Schwegler, Karla Baltner, Lisa Schwab, Katrin Haag und *Annalena Wallisch*, die ich als Studenten oder Praktikanten betreuen durfte und die dieses Projekt maßgeblich voranbrachten.

Allen, die meinen Alltag sowohl im Labor als auch außerhalb bereichert und dazu beigetragen haben, dass ich meine Promotion erfolgreich abschließen konnte. *Karla Baltner, Ann-Christin Krahl, Katharina Reinhardt, Karin Cabanillas-Stanchi, Lisa Schwab, Franziska Wiese, Jennifer Rottenberger* und *Darina Siegmund*, die mit mir diskutiert und mich weitergebracht haben. Mein Erfolg ist auch der aller, die dabei waren. Vielen Dank!

Mein besonderer Dank gilt:

Meinen beiden Schwestern *Melanie Pal* und *Miriam Steffen*, die mir als Nesthäkchen bereits während der Schulzeit und des Studiums bei kniffligen Hausaufgaben, Präsentationen oder Abschlussarbeiten mit Rat und Tat zur Seite standen und mir durch die Abnahme so mancher Hausarbeit ermöglichten, mich voll und ganz auf meine spätere wissenschaftliche Laufbahn zu konzentrieren ;)

Meinen *Eltern*. Vielen Dank die dauerhafte Unterstützung, die mir mein Studium und die Promotion erst möglich gemacht und mir stets viel Kraft gegeben hat!

Marvin, der mich in jeglicher Hinsicht unterstützt und motiviert hat und mir immer zur Seite stand. Ich möchte, dass du weißt, wie unschätzbar wertvoll du für mich bist. Ohne dich hätte ich das sicher nicht geschafft!

Vielen Dank Euch allen!