

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
der Albert Ludwigs Universität Freiburg im Breisgau



**„Missing Self“-Erkennung von Klasse I MHC-negativen Zellen durch Natürliche
Killerzellen benötigt eine Funktionsbahnung durch Dendritische Zellen und
Typ-I-Interferone**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau

Vorgelegt 2012

von

Simon Lißmann

geboren in Gießen

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Hubert E. Blum
1.Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Diefenbach
2.Gutachter: Prof. Dr. med. Marco Idzko
Jahr der Promotion: 2013

Meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das angeborene Immunsystem	1
1.1.1	Mechanismen zur Erkennung fremder Strukturen und potentieller Gefahren	1
1.1.2	Akteure des angeborenen Immunsystems	2
1.2	Die Rolle Natürlicher Killerzellen im Immunsystem	3
1.2.1	Definition und Phänotyp	3
1.2.2	Aufgaben	5
1.3	Erkennungsmechanismen Natürlicher Killerzellen	6
1.3.1	„Missing self“-Erkennung	6
1.3.2	„Induced self“-Erkennung	9
1.3.3	<i>Dynamic equilibrium concept</i>	10
1.4	NK-Zellen und Dendritische Zellen im Crosstalk der Immunreaktion	11
1.5	Das angeborene Immunsystem in der Tumorzellkontrolle	13
1.6	Fragestellung und Signifikanz der Arbeit	16
2	MATERIAL UND METHODEN	17
2.1	Material	17
2.1.1	Laborgeräte	17
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	17
2.1.3	Chemikalien	18
2.1.4	Enzyme	19
2.1.5	Antikörper	19
2.1.6	Fluorochrome	19
2.1.7	Software	19
2.1.8	Puffer und Kulturmedien	20
2.1.9	Zelllinien	20
2.1.10	Versuchstiere	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Zellzählung	22
2.2.2	Organe wiegen	22

2.2.3	<i>In-vivo</i> -Stimulation von NK-Zellen	22
2.2.4	⁵¹ Chrom-Freisetzungssassay	22
2.2.5	Interferon- γ -Freisetzungssassay	23
2.2.6	<i>In-vivo</i> -Depletion Natürlicher Killerzellen	24
2.2.7	<i>In-vivo</i> -Depletion Dendritischer Zellen	24
2.2.8	<i>In-vivo</i> -Abstoßungssassay	24
2.2.9	Grundlagen: Durchflusszytometrie	28
2.2.10	Durchflusszytometrie im <i>In-vivo</i> -Abstoßungssassay	30
2.2.11	Histogramm- und Quotientendarstellung CFSE-positiver Zellen	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	<i>In-vitro</i>-Abstoßung von <i>B2m</i>^{-/-}-Zellen	32
3.1.1	Keine <i>In-vitro</i> -Lyse von <i>B2m</i> ^{-/-} -Zellen ohne vorherige <i>In-vivo</i> -Stimulation	32
3.1.2	Die Immunisierung mit apoptotischen Zellen erzeugt keine Aktivitätssteigerung Natürlicher Killerzellen	33
3.2	Grundlagen des <i>In-vivo</i>-<i>B2m</i>^{-/-}-Abstoßungssassays	34
3.2.1	<i>B2m</i> ^{-/-} -Zellen werden innerhalb von sechs Tagen fast vollständig abgestoßen	36
3.2.2	Die <i>In-vivo</i> -Abstoßung von <i>B2m</i> ^{-/-} -Zellen ist direkt abhängig von NK-Zellen	38
3.3	Die Depletion von CD11c⁺-Zellen führt zu einem Verlust der Abstoßungs- kompetenz gegenüber <i>B2m</i>^{-/-}-Zellen	40
3.4	Das Typ-I-Interferonsystem in der Abstoßung von <i>B2m</i>^{-/-}-Zellen	42
3.4.1	Keine Abstoßung von <i>B2m</i> ^{-/-} -Zellen in <i>Ifnar</i> ^{-/-} -Mäusen	42
3.4.2	α Interferone, nicht aber Interferon- β stellen einen kritischen Faktor in der Abstoßung von <i>B2m</i> ^{-/-} -Zellen dar	44
3.5	Regelrechte <i>In-vivo</i>-Abstoßung von <i>B2m</i>^{-/-}-Zellen in IL-12-defizienten Mäusen	45
3.6	Übertragung des <i>In-vivo</i>-<i>B2m</i>^{-/-}-Abstoßungssassays auf RMA-S-Zellen	46
3.6.1	Unstimulierte NK-Zellen zeigen <i>in vitro</i> eine nur geringe Aktivität gegenüber RMA-S-Zellen	46
3.6.2	Nach intravenöser Injektion von RMA- und RMA-S-Zellen zeigt sich die Lunge als das Organ mit der größten Tumorzelllast	48
3.6.3	Die <i>In-vivo</i> -Abstoßung von RMA-S-Zellen ist abhängig von NK-, nicht aber von NKT- Zellen	49

3.6.4	Die Depletion Dendritischer Zellen führt zu einer eingeschränkten <i>In-vivo</i> -Abstoßung von RMA-S-Zellen	50
3.6.5	Keine Einschränkung der <i>In-vivo</i> -Abstoßung von RMA-S-Zellen in <i>Ifnar</i> ^{-/-} -Mäusen	51
3.6.6	Weitere Faktoren in der <i>In-vivo</i> -Abstoßung von RMA-S-Zellen	52
3.6.7	Die RMA-S-Abstoßung findet innerhalb von 24 Stunden statt	53
4	DISKUSSION	54
4.1	Die Abstoßung von <i>B2m</i>^{-/-}-Zellen findet abhängig von Natürlichen Killerzellen statt und verlangt vorausgehende <i>In-vivo</i>-Stimuli	54
4.1.1	NK-Zellen benötigen eine <i>In-vivo</i> -Aktivierung zur Erlangung vollständiger Lysekompetenz gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen	54
4.1.2	Charakteristika der NK-abhängigen Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen	56
4.2	Dendritische Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen	57
4.2.1	Zwei mögliche Mechanismen zur Bahnung der NK-Zell-Effektorfunktion	58
4.2.2	Einflussnehmende Mechanismen unabhängig von Dendritischen Zellen	60
4.3	Das Typ-I-Interferon-System trägt entscheidend zur Funktionsbahnung Natürlicher Killerzellen bei	61
4.4	Die Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen ist unabhängig von den Interleukinen 12, 23 und 35	63
4.5	RMA-S-Lymphomzellen werden abhängig von Dendritischen Zellen aber unabhängig vom Typ-I-Interferonsystem abgestoßen	65
4.6	Ausblick	68
5	ZUSAMMENFASSUNG	69
6	LITERATURVERZEICHNIS	70
7	LEBENS LAUF	82
8	DANKSAGUNG	83

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
B6	C57BL/6
CD	Cluster of differentiation
CFSE	5-(und 6-)Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester
CMV	Zytomegalievirus
ConA	Concanavalin A
Cpm	counts per minute
CTL-Zellen	zytotoxische T-Lymphozyten
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherie-Toxin
DTR	Diphtherie-Toxin-Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorter (Durchflusszytometrie)
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorezeinisothiocyanat
FSC	Forward scatter
H60	Minor histocompatibility antigen 60
HBSS	Hank's balanced salt solution
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IFN	Interferon
IFNAR	Typ-I-Interferon Rezeptor
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	Major histocompatibility complex
MULT-1	Murine ULBP-like transcript 1
NKG2D	Natural Killer Group 2 Member D

NKT	Natürliche Killer T-Zelle
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogene associated molecular pattern (Musterstruktur)
PBS	Phosphate buffered saline
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-a
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMT	Photomultiplier tube
poly(I:C)	Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR	Pattern-recognition receptor (Mustererkennungsrezeptor)
Rae-1	Retinoic acid early-1
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rounds per minute
SSC	Side scatter
Tab.	Tabelle
Tg	transgen
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-beta
β_2 M	Beta ₂ -Mikroglobulin

1 EINLEITUNG

1.1 Das angeborene Immunsystem

Unter dem Begriff des angeborenen Immunsystems werden alle Zellen und Mechanismen zusammengefasst, die den Organismus von Geburt an vor endogenen und exogenen Gefahren schützen. Neben der direkten Abwehr von Pathogenen dient es der Initiierung und Aktivierung des adaptiven Immunsystems. Dabei agiert auch das angeborene Immunsystem bei weitem nicht ungerichtet, sondern ist in der Lage, gezielt auf Bedrohungen des Körpers zu reagieren. Neben der physikalischen Barriere der Haut und ihres pH-Wertes machen myeloide Zellen wie Granulozyten, Makrophagen und Dendritische Zellen den größten zellulären Anteil aus. Ebenfalls zum angeborenen Immunsystem werden jedoch auch die lymphozytären Natürlichen Killerzellen gezählt.

1.1.1 Mechanismen zur Erkennung fremder Strukturen und potentieller Gefahren

Mustererkennungsrezeptoren (*Pattern recognition receptors*, PRR) können an bestimmte Musterstrukturen (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP) von Bakterien binden und stellen die Basis zur Erkennung mikrobieller Erreger durch myeloide Zellen des Immunsystems (Makrophagen, Dendritische Zellen, etc.) dar. Es werden dabei nur solche Strukturen erkannt, die sich nicht auf körpereigenen Zellen finden, sodass eine grundlegende Differenzierung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ ermöglicht wird (Medzhitov and Janeway, 1997).

Neben anderen gehören zu den PRRs auch Toll-ähnliche Rezeptoren (TLR), die aufgrund vielfältiger Untergruppen ein breites Spektrum an exogenen Pathogenmustern erkennen können. Dazu zählen insbesondere bakterielle und virale Strukturen wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) und doppelsträngige RNA (Beutler, 2009). Das synthetische, zur experimentellen TLR-Stimulation häufig eingesetzte poly(I:C) ist ein Mimik viraler Doppelstrang-RNA und wird vom Immunsystem als PAMP wahrgenommen. Die Erfassung von Musterstrukturen bietet auf diese Weise keine den Rezeptoren des adaptiven Immunsystems vergleichbare Spezifität, ermöglicht aber eine unmittelbare und effiziente Reaktion auf fremde Pathogene und die Einleitung darauffolgender spezifischer Abwehrmechanismen.

Dieses Modell der „Selbst/Nicht-Selbst Differenzierung“ (Medzhitov and Janeway, 1997) wird durch einen weiteren Mechanismus zum Schutz des Organismus ergänzt. Das sogenannte „Gefahrenmodell“ (danger-modell) geht davon aus, dass nicht nur „Selbst“ von „Fremd“, sondern auch „Gefahr“ von „Harmlosigkeit“ unterschieden werden kann (Matzinger, 1994). Die Unterscheidung basiert hier auf Alarmsignalen, die auch von körpereigenen Zellen stammen können. Dabei kann es sich um Strukturen handeln, die normalerweise nicht an die Zelloberfläche gelangen, wie beispielsweise DNA. Ihr

Freiwerden deutet auf gravierende zelluläre Schädigungen, wie Nekrosen oder Gewebetraumata, hin. Auch können stressinduzierte Proteine, z.B. sezernierte Hitzeschockproteine oder bestimmte Oberflächenmoleküle, eine innere Gefährdungssituation der Körperzelle nach außen vermitteln. Da das angeborene Immunsystem neben der initialen Abwehr von Infektionen auch der kontrollierten Beseitigung körpereigener Zellen dient, stellt gerade diese Reaktion auf Zellen unter Stress oder potentiell gefährliche Zellen (wie etwa Tumorzellen) einen interessanten Aspekt in der Funktionsweise des angeborenen Immunsystems dar.

Das Zusammenspiel aus der Erkennung fremder Musterstrukturen und kostimulatorischer Alarmsignale ermöglicht eine effektive Immunantwort. Deutlich wird dabei aber auch, dass beim Fehlen körperfremder Strukturen, wie es etwa bei Tumorzellen der Fall ist, das Immunsystem weniger stimuliert werden kann und daher die Tumorzellabwehr erschwert ist. Das heißt gerade in der Abwehr transformierter Zellen besitzt die Erkennung körpereigener, jedoch veränderter Strukturen eine große Bedeutung.

1.1.2 Akteure des angeborenen Immunsystems

Träger der dargestellten Mustererkennungsrezeptoren sind insbesondere die Phagozyten des angeborenen Immunsystems. Dabei stellen Makrophagen, als gewebeansässige und meist spezialisierte Formen der im Blut zirkulierenden Monozyten, oft die erste Abwehr von eingedrungenen Mikroorganismen dar. Gemeinsam mit neutrophilen Granulozyten, die durch frühe inflammatorische Signale rekrutiert werden, ermöglichen sie die Phagozytose von Pathogenen, ohne dabei auf die Hilfe anderer Zellen angewiesen zu sein (Janeway, 2008).

Dendritische Zellen (DC) dienen dagegen weniger der mengenmäßigen Beseitigung von Pathogenen als vielmehr der Vermittlung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Unreife Dendritische Zellen finden sich im peripheren Blut, Organen und Schleimhäuten (Steinman, 2003). Sie sind auf die stete Kontrolle von fremden Antigenen spezialisiert. Größere Partikel werden dabei via Phagozytose aufgenommen, extrazelluläre Flüssigkeit und lösliche Bestandteile dagegen durch einen Vorgang, der Makropinozytose genannt wird. Aufgenommene Partikel werden prozessiert und führen zur Reifung der Dendritischen Zellen. Diese wandern daraufhin in die lymphatischen Gewebe, exprimieren große Mengen an Klasse II MHC-Komplexen sowie kostimulatorischen Signalen und ermöglichen so eine Präsentation der Antigene gegenüber naiven T-Zellen. Dabei kann eine Dendritische Zelle bis zu 3.000 T-Zellen aktivieren, mit der Folge einer deutlichen Signalverstärkung in der Initiierung einer adaptiven Immunantwort (Banchereau and Steinman, 1998). Diese kann sich je nach aufgenommenen Proteinen nicht nur gegen fremde Mikroorganismen, sondern auch gegen Tumorantigene richten (Zitvogel et al., 1996). Da körpereigene, wenn auch veränderte, Strukturen

jedoch keine den körperfremden Antigenen vergleichbare Aktivierungspotenz besitzen und hauptsächlich durch kostimulatorische Signale vermittelt werden, ist die Antwort auf Tumorantigene, verglichen mit der starken Immunantwort auf mikrobiologische Pathogene, häufig deutlich schwächer. Neben direkten rezeptorvermittelten Zellkontakten ermöglicht die Sekretion von IL-12 und anderen Zytokinen eine zusätzliche Aktivierung und Regulierung sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems. Dabei wirken Dendritische Zellen auf die Entwicklung zur Th1- oder Th2-Antwort ein und aktivieren Natürliche Killerzellen (Banchereau and Steinman, 1998). Vor einigen Jahren wurde die zentrale Rolle von Dendritischen Zellen für das Entstehen adaptiver Immunantworten in genetisch veränderten Mäusen untersucht, in denen man Dendritische Zellen induzierbar depletieren kann (Jung et al., 2002). In der Abwesenheit von Dendritischen Zellen konnten keine potenten CD8 T-Zell-Antworten gegen Modellantigene, Bakterien (*Listeria monocytogenes*) und Parasiten (Malaria Sporozoiten) mehr generiert werden.

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) nehmen als Lymphozyten eine Sonderstellung innerhalb des angeborenen Immunsystems und dessen „Selbst/Nicht-Selbst Differenzierung“ ein. Sie stehen ihrer Herkunft nach den Zellen des adaptiven Immunsystems näher, da sie von derselben lymphatischen Vorläuferzelle abstammen (Kondo et al., 1997). NK-Zellen besitzen dabei aber eine Rezeptorausstattung, die es ihnen ermöglicht, auf breiter Basis körpereigene, virusinfizierte oder neoplastisch veränderte Zellen zu erkennen (Trinchieri, 1989). Ein häufiges und gemeinsames Merkmal dieser pathologisch veränderten Zellen ist deren verminderte „Selbst-Präsentation“ infolge Abregulierung von Klasse I MHC-Proteinen. Natürliche Killerzellen gewährleisten daher eine Ausweitung der „Nicht-Selbst Identifikation“ von einer „Fremd“-Erkennung auf die Erkennung eines „fehlenden Selbst“ (Kärre et al., 1986).

Der zelluläre Teil des angeborenen Immunsystems wird durch einen humoralen Teil unterstützt. Verschiedenste Faktoren wie das Komplementsystem, akute Phase Proteine und von Immunzellen sezernierte Zytokine vermitteln die Mechanismen des angeborenen Immunsystems untereinander, unterstützen die Initiierung der adaptiven Immunantwort und üben zum Teil selber Effektorfunktionen aus (Janeway, 2008).

1.2 Die Rolle Natürlicher Killerzellen im Immunsystem

1.2.1 Definition und Phänotyp

Neben T- und B-Lymphozyten stellen Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) eine weitere eigenständige Lymphozyten-Linie („lineage“) dar. Wie T- und B-Zellen stammen sie ebenfalls von lymphatischen Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab (Lanier et al., 1986) und machen, neben den zytotoxischen

T-Zellen des adaptiven Immunsystems, die zytotoxische Zellpopulation des angeborenen Immunsystems aus. Morphologisch erscheinen sie dabei als relativ große, granulierte Zellen, deren Granula u.a. Perforin und Granzym B enthalten (Clement et al., 1990). Gemeinsam dienen beide Proteine der effektiven Zelllyse, indem Perforin, nach Ausschüttung aus den Granula, zu einer Porenbildung in der Zellmembran von Targetzellen führt und dabei den Eintritt der Granzyme in deren Zytoplasma vermittelt. Als Serinproteasen bewirken die Granzyme dort schließlich eine Apoptose der Targetzellen (Janeway, 2008; Podack et al., 1985). Ebenfalls in Granula gespeichert werden die von der Zelle produzierten Zytokine. Hierzu zählen insbesondere Interferon (IFN)- γ und Tumornekrose-Faktor (TNF)- α (Anegón et al., 1988).

In der immunphänotypischen Betrachtung werden Natürliche Killerzellen zur Abgrenzung gegenüber anderen Lymphozytenpopulationen durch eine fehlende Expression von CD3 ϵ und im Fall von humanen NK-Zellen, die Anwesenheit von CD16 und CD56, definiert. CD56 wird jedoch nicht von murinen NK-Zellen exprimiert, sodass hier andere Marker wie NKp46 oder NK1.1 zur Abgrenzung dienen. Letzterer wird allerdings auch von einer Subpopulation zytotoxischer T-Zellen und Natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen) exprimiert, sodass NKp46 als spezifischster Marker gesehen werden kann, wenngleich sich auch dieser auf distinkten anderen Zellpopulationen wie den Lymphoid Tissue Inducer Cells (LTi-Zellen) und mukosalen ROR γ t⁺-Zellen nachweisen lässt (Sanos et al., 2009; Walzer et al., 2007a, 2007b).

Reifungsstadien muriner NK-Zellen können anhand von CD11b und CD27 differenziert werden (Hayakawa and Smyth, 2006). Dabei lässt sich eine Entwicklung in vier Schritten beobachten (Chiossone et al., 2009), bei der unreife NK-Zellen durch einen CD11b^{low}CD27^{low} doppelt negativen Phänotyp charakterisiert werden. Sie stellen jedoch den Subtyp mit der höchsten Proliferationsrate dar. Es findet im Folgenden eine Entwicklung über noch unreife CD11b^{low}CD27^{high}-Zellen zu reifen, doppelt positiven CD11b^{high}CD27^{high} NK-Zellen statt. Diese stellen die, bezogen auf ihre Zytotoxizität und Zytokinsekretion, aktivste Subpopulation dar und finden sich insbesondere in Lymphknoten und der Milz. Nach *In-vivo*-Aktivierung durch poly(I:C) oder Tiloron machen sie den größten Anteil an NK-Zellen aus (Hayakawa et al., 2008; Vahlne et al., 2008). Die letzte Reifungsstufe wird durch einen CD11b^{high}CD27^{low}-Phänotyp charakterisiert und zeigt die niedrigste Proliferationsrate aller Entwicklungsstufen. NK-Zellen dieses Stadiums finden sich insbesondere im peripheren Blut und nichtlymphatischem Gewebe (Hayakawa and Smyth, 2006; Kim et al., 2002).

Entsprechend der Verteilung von Subpopulationen lassen sich NK-Zellen sowohl im lymphatischen als auch im nicht-lymphatischen Gewebe nachweisen. Ihren größten Anteil an der Lymphozytenfraktion haben sie mit etwa 10% in der Lunge. In anderen Organen liegt ihr Anteil, mit beispielsweise 2% bis 4% in der Milz, deutlich geringer (Grégoire et al., 2007; Oppenheim et al., 2005). Ihr Anteil im

peripheren Blut kann dagegen zwischen 5% und 30% variieren (Bisset et al., 2004), wobei man von einer mittleren Lebensdauer von etwa zwei Wochen ausgehen kann (Jamieson et al., 2004).

1.2.2 Aufgaben

Untersuchungen von Krankheiten infolge fehlender oder funktionsgestörter NK-Zellen geben schon klinisch Hinweise auf deren Aufgaben. So zeigt sich eine deutlich erhöhte Virusanfälligkeit insbesondere gegenüber Herpesviren (Orange, 2006). Auch zeigt sich ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung bestimmter Neoplasien, wie beispielsweise von Lymphomen (Imai et al., 2000). Diese Ergebnisse verdeutlichen bereits zwei der wichtigsten und durch zahlreiche experimentelle Studien (Cerwenka and Lanier, 2001; Shereck et al., 2007) bestätigte Funktionen von NK-Zellen, das heißt die Abwehr von 1. virusinfizierten Zellen und 2. tumorveränderten Zellen. Daneben können aber auch andere Zellen mit Anzeichen zellulären Stresses von NK-Zellen attackiert werden.

Zu den Aufgaben von NK-Zellen zählen jedoch nicht nur direkte zytotoxische Effektorfunktionen. Sie sind gleichfalls in eine Vielzahl immunmodulatorischer Vorgänge eingebunden. NK-Zellen haben dabei durch Sekretion von Zytokinen oder direkten Zellkontakt Einfluss auf verschiedenste Zellen des Immunsystems. So werden Makrophagen zur Phagozytose und Präsentation von Antigenen stimuliert (Mosser and Edwards, 2008), Dendritische Zellen in ihrem Reifungsprozess unterstützt (Piccioli et al., 2002) und eine Beeinflussung bis hin zur Aktivierung der adaptiven Immunantwort erreicht (Hayakawa et al., 2002; Kelly et al., 2002; Mocikat et al., 2003). Wie auch Dendritische Zellen, mit denen sie in engstem Kontakt stehen, dienen NK-Zellen daher als wichtiges Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem.

Zunehmend wird deutlich, dass Natürliche Killerzellen neben diesen häufig diskutierten Funktionen auch in anderen Bereichen eine Bedeutung besitzen. So können NK-Zellen sowohl zur Exazerbation als auch zur Limitation von Autoimmunkrankheiten beitragen (Schleinitz et al., 2010), haben einen Anteil an Hypersensitivitätsreaktionen (Erten et al., 2008) und spielen eine entscheidende Rolle im Rahmen der Immunreaktionen nach Organ- und Knochenmarktransplantationen (Gill, 2010; Hamby et al., 2007). Dabei fördern sie einen Graft-versus-Leukemia-Effekt und unterdrücken die Graft-versus-Host-Erkrankung durch Supprimierung antigenpräsentierender Dendritischer Zellen (Ljunggren and Malmberg, 2007). Darüber hinaus gibt es einige Hinweise zur Beteiligung an der maternofetalen Toleranz (Lightner et al., 2008) und zur Vermeidung einer Endometriose (Osuga et al., 2011).

1.3 Erkennungsmechanismen Natürlicher Killerzellen

Das Immunsystem hat im Laufe seiner Entwicklung verschiedenste, zum Teil hochkomplexe, Mechanismen hervorgebracht, um potentielle Gefahren für den Organismus erkennen und gegebenenfalls beseitigen zu können. Dabei lassen sich vier Hauptwege differenzieren (Diefenbach and Raulet, 2001).

Die größte Varianz an Rezeptorspezifität zeigen T- und B-Zellrezeptoren bzw. von Plasmazellen sezernierte Antikörper. Derart spezialisierte, antigenspezifische Rezeptoren finden sich auf Natürlichen Killerzellen nicht. Ein zweiter Mechanismus wird durch Toll-like-Rezeptoren (TLRs) ermöglicht. Als Immunorezeptoren zur Erkennung insbesondere von Mikroorganismen bzw. deren Bestandteilen wie Bakterienwänden, Flagellen oder DNA- und RNA-Fragmenten stellen sie ein entwicklungsgeschichtlich sehr altes System der Erkennung dar. Besondere Bedeutung besitzen sie in der „Fremd“-Erkennung durch Phagozyten der myeloiden Zellreihe. Humane Natürliche Killerzellen besitzen ebenfalls Toll-like-Rezeptoren, deren Signifikanz bis dato jedoch unklar ist.

1.3.1 „Missing self“-Erkennung

Die Aktivierung Natürlicher Killerzellen wird hauptsächlich durch zwei andere Mechanismen gewährleistet. Alle kernhaltigen Körperzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Klasse I MHC-Proteine. Diese setzen sich aus den drei α_1 -, α_2 - und α_3 -Domänen einer schweren Kette sowie einer nicht kovalent gebundenen leichten Kette ohne Transmembranregion, dem Beta₂-Mikroglobulin (β_2 M), zusammen (Nathenson et al., 1981) (Abb. 1).

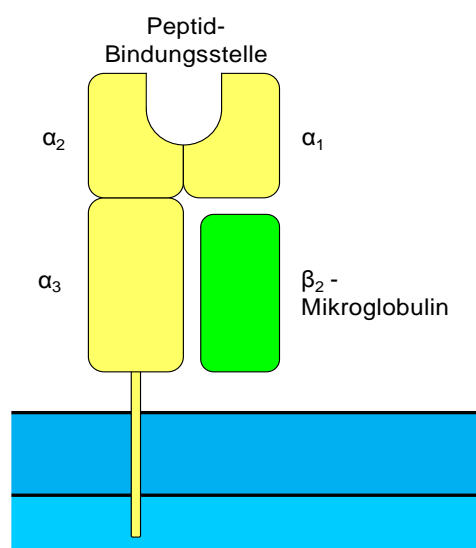


Abb. 1: Klasse I MHC-Komplex (modifiziert nach Janeway (Janeway, 2008))

Die schweren Ketten werden in Mäusen vom sogenannten H-2-Locus kodiert, dessen Wegfall oder Veränderung zu einer Defizienz des Klasse I MHC-Komplexes führt. Zur Stabilisierung der schweren Kette dient das, für den strukturellen Aufbau gleichsam bedeutende, Beta₂-Mikroglobulin, ein aus hundert Aminosäuren bestehendes einkettiges Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 11,8 kD. Namensgebend ist dessen Auftreten in der β -Fraktion nach elektrophoretischer Trennung von Serumproteinen. Die Bedeutsamkeit von Beta₂-Mikroglobulin wurde in Mäusen bestätigt, denen das Beta₂-Mikroglobulin-Gen fehlt. Alle Zellen dieser Tiere exprimieren keine Klasse I MHC-Proteine auf der Zelloberfläche (Koller et al., 1990).

Funktionell dienen Klasse I MHC-Komplexe als Rezeptoren zur Präsentation endogener Peptidfragmente. Die Zelle gibt auf diese Weise nach außen preis, welche Vorgänge intrazellulär ablaufen. Zytotoxische T-Zellen kontrollieren die präsentierten Peptidfragmente und können so krankhafte Vorgänge in der Zelle erkennen. Erfassen sie beispielsweise virusinduzierte Transkripte auf der Zelloberfläche, leiten sie die Lyse der betroffenen Zelle ein. Einige Viren, wie unter anderem das Zytomegalievirus (CMV), haben im Rahmen ihrer Immunevasion Mechanismen entwickelt, um diesem Kontrollsystem zu entgehen. Sie sind in der Lage, die Klasse I MHC-Expression der Zelle abzuregulieren oder sie zu blockieren, sodass kein virales Fremdprotein von der Zelle präsentiert werden kann (del Val et al., 1992). Dieses Phänomen lässt sich reaktiv auch bei tumorveränderten Zellen und Zellen unter erhöhtem Stress beobachten.

Während die T-Zell-medierte Immunantwort durch Abregulierung von Klasse I MHC-Expression geschwächt wird, können Natürliche Killerzellen diese fehlende Selbstpräsentation erkennen. So werden Tumorzellen der gleichen Zelllinie, die sich einzig im Ausmaß der Klasse I MHC-Expression unterscheiden, von NK-Zellen unterschiedlich behandelt. Diejenigen Tumorzellen, die eine verminderte MHC-I-Expression aufweisen, werden von NK-Zellen erkannt und lysiert. Dieselben Tumorzellen mit vorhandener MHC-I-Expression werden dagegen von der Lyse verschont. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass die Expression von Klasse I MHC-Proteinen einhergeht mit einer Inhibition von NK-Zellen, bzw. im Umkehrschluss das Fehlen der MHC-I-Expression NK-Zellen enthemmen kann. Man spricht dabei von der sogenannten „missing self“-Theorie (Kärre et al., 1986). Zur ursprünglichen Untersuchung dieser Theorie war es notwendig, Zellvarianten zu vergleichen, die sich einzig im Grad ihrer Klasse I MHC-Expression unterscheiden.

1.3.1.1 RMA-S-Zellen als klassisches Modell der „Missing self“-Erkennung

Ein solches Paar an stabilen Zellvarianten stellen RMA- und RMA-S-Zellen dar. Um diese zu erschaffen, wurden von C57BL/6 Mäusen stammende RBL-5 T-Lymphomzellen mit Etyhlmethansulfonat mutagenisiert und anschließend mithilfe von monoklonalen Antikörpern gegen Klasse I MHC-

Komplexe auf ihre H-2-Defizienz selektioniert (Ljunggren and Kärre, 1985). Mutagenisierte, jedoch nicht selektionierte RBL-5-Zellen wurden fortan als RMA-Zellen, mutagenisierte und auf H-2-Defizienz selektionierte Zellen als RMA-selected, kurz RMA-S-Zellen, bezeichnet. Die Prozedur der Mutagenisierung und Selektionierung wurde mehrfach durchgeführt, sodass schlussendlich zwei Zellvarianten entstanden mit einerseits stabiler Klasse I MHC-Expression im Falle der RMA-Zellen gegenüber andererseits stabiler Klasse I MHC-Defizienz in RMA-S-Zellen. Als molekulare Ursache der Defizienz konnte später ein vorzeitiges Stop-Codon im Antigenpeptid-Transporter-Gen 2 (TAP2) identifiziert werden (Yang et al., 1992). Die Störung des TAP2 führt zu einem eingeschränkten Transport von Peptidfragmenten aus dem Zytoplasma in das Endoplasmatische Retikulum und folglich zu einer gestörten Peptid-Beladung der Klasse I MHC-Komplexe, die daraufhin nicht an der Zelloberfläche exprimiert werden.

Folgende Untersuchungen bestätigten, dass die Klasse I MHC-Expressionsrate auch nach *In-vivo*-Transfer konstant niedrig blieb (Ljunggren and Kärre, 1985), d.h. RMA-S-Zellen nicht (wie in Tumorzellen gelegentlich beobachtet (Finn et al., 1978)) ihre Expression steigerten. RMA- und RMA-S-Zellen ermöglichten dadurch ein Grundlagenmodell für früheste Untersuchungen zur „missing self“-Theorie. Nach subkutaner Injektion der Tumorzellen zeigten sich dabei RMA-Zellen als deutlich maligner und bildeten stets innerhalb von zwei bis drei Wochen einen soliden Tumor, wohingegen RMA-S-Zellen eine solche Potenz nicht aufweisen konnten. Die vermutete Abstoßung der auf H-2-Defizienz selektionierten Tumorzellen wurde dabei als T-Zell-unabhängig, aber NK-abhängig beschrieben und konnte entsprechend durch Depletion Natürlicher Killerzellen vollständig aufgehoben werden (Kärre et al., 1986).

1.3.1.2 *Beta₂-Mikroglobulin – Schlüsselprotein im Klasse I MHC-Komplex*

Der Mechanismus kann gleichwohl auch auf nicht neoplastisch veränderte Körperzellen übertragen werden. So zeigte sich, dass genetisch Klasse I MHC-defiziente hämatopoetische Zellen nach Transfer in bestrahlte, jedoch NK-Zell-kompetente Mäuse, signifikant anfälliger gegenüber NK-Zell-mediiertes Zellyse sind als vergleichbare hämatopoetische Zellen mit regelrechter Klasse I MHC-Expression (Bix et al., 1991). Neben dem Verlust der schweren Kette kann auch ein Verlust des Beta₂-Mikroglobulins zu einer Störung des Klasse I MHC-Komplexes führen. Fehlt diese leichte Kette, wie beispielsweise in *B2m*^{-/-}-Mäusen (Koller et al., 1990; Zijlstra et al., 1989), so kommt es zur Instabilisierung des Klasse I MHC-Komplexes mit der Folge einer deutlich reduzierten Oberflächenexpression von Klasse I MHC-Komplexen. Es verbleibt jedoch eine geringe Restexpression (Raulet, 1994).

Diese durch Verlust von β_2M entstehende funktionelle Klasse I MHC-Defizienz kann sich in der Untersuchung von NK-Zellen und zytotoxischen T-Zellen zu Nutze gemacht werden. So stellen Zellen

ohne Expression von Klasse I MHC, gemäß der dargestellten „*missing self*“-Theorie, ein klassisches Target für Natürliche Killerzellen dar, werden aber von T-Zellen nicht erkannt. In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass β_2 M-defiziente T-Zell-Blasten durch NK-Zellen immunkompetenter B6-Mäuse lysiert werden, deren homo- oder heterozygot β_2 M-positiven Counterparts jedoch weitestgehend resistent gegen die Lyse bleiben (Höglund et al., 1991; Liao et al., 1991).

Diese Erkenntnisse zeigen die wichtige Schlüsselrolle des Beta₂-Mikroglobulins für die Funktion des Klasse I MHC-Komplexes und das daraus resultierende Potential β_2 M-defizienter Zellen, in der Forschung als klassisches Target für Natürliche Killerzellen verwendet zu werden. Durch ihre Analogie zu Tumorzellen, deren häufiges Merkmal ebenfalls eine verringerte Expression von Klasse I MHC ist, eignen sie sich daher insbesondere auch zur Untersuchung der NK-abhängigen Abstoßung von Tumorzellen.

Die „*missing self*“-Erkennung, d.h. die Strategie, eine fehlende Selbstpräsentation der Körperzellen zu erkennen und als krankhaft zu deuten, stellt einen ersten entscheidenden Mechanismus der Targetzell-Erkennung durch NK-Zellen dar.

1.3.2 „*Induced self*“-Erkennung

Dem gegenüber stehen die Mechanismen der „*induced self*“-Erkennung (Diefenbach and Raulet, 2001). Aus der Beobachtung heraus, dass es auch Zellen ohne Klasse I MHC-Expression gibt, die dennoch nicht effizient von Natürlichen Killerzellen lysiert werden, lässt sich schließen, dass es neben der Enthemmung auch direkte NK-Zell-aktivierende Prozesse geben muss (Ljunggren and Kärre, 1990). Körperzellen können aktiv auf zellulären Stress, virale Infektionen und Tumortransformation antworten. Infolge dieser Belastungen kommt es zu einer reaktiven Überexpression bestimmter Liganden auf der Zelloberfläche. Kranke Zellen zeigen auf diese Weise ihre Veränderung selber an und bieten sich der Lyse durch NK-Zellen und anderen immunologisch aktiven Zellen regelrecht an. Der Schutz des Zellverbandes steht dabei über dem Schicksal der einzelnen Zelle.

Eine der, für die NK-Zell-Aktivierung bedeutendsten, Rezeptor-Liganden-Interaktionen ist die des NKG2D-Rezeptors (Natural Killer Group 2 Member D). Seine Liganden unterscheiden sich zwischen Mensch und Maus. Murine Liganden sind Rae-1 (retinoic acid early-1), H60 (minor histocompatibility antigen 60) (Cerwenka et al., 2000; Diefenbach et al., 2000) und MULT-1 (murine ULBP-like transcript 1) (Carayannopoulos et al., 2002). Rae-1 wird dabei kaum auf gesunden Körperzellen exprimiert. Eine besonders hohe Expression findet sich dagegen auf Tumorzellen und infolge zellulärer DNA-Schäden (Gasser et al., 2005), weshalb der Ligand von Natürlichen Killerzellen als spezifisches Alarmsignal gewertet wird. Folge ist eine, von der Expressionsstärke des Liganden abhängige NK-Zell-Aktivierung.

Sowohl Rae-1, als auch H60 induzieren bei NK-Zellen nicht nur eine starke Zytotoxizität, sondern setzen ebenso einen starken Reiz zur Freisetzung von IFN- γ . Es kann davon ausgegangen werden, dass NKG2D-vermittelte Signale potent genug sind, trotz gleichzeitiger inhibitorischer Signale durch Klasse I MHC, das Gleichgewicht der NK-Zellen auf Seiten ihrer Aktivierung zu verschieben (Diefenbach et al., 2001). Die zentrale Bedeutung des Rezeptors wird in der eingeschränkten Tumorsurveillance von NKG2D-Knockoutmäusen deutlich. Diese zeigen ein, verglichen mit Wildtypmäusen, verstärktes Tumorstadium, obwohl gleichzeitig eine erhöhte Expression an NKG2D-Liganden auf den Tumorzellen selbst nachgewiesen werden kann (Guerra et al., 2008). Manche Tumoren bewirken eine Abregulierung der NKG2D-Rezeptoren auf Effektorzellen durch Freisetzung löslicher NKG2D-Liganden und erreichen so eine wirksame Immunevasion (Groh et al., 2002).

1.3.3 *Dynamic equilibrium concept*

NK-Zellen verrechnen praktisch die aktivierenden Signale der Stressliganden mit den hemmenden Signalen der Klasse I MHC-Proteine. Die Summe dieser Einflüsse führt zur Entscheidung, ob eine Natürliche Killerzelle inhibiert bleibt, oder die Lyse der Körperzelle einleitet. Man bezeichnet diese stete Integration verschiedener Signale zur Aktivierungsentscheidung auch als „*dynamic equilibrium concept*“ (Vivier et al., 2004) (Abb. 2).

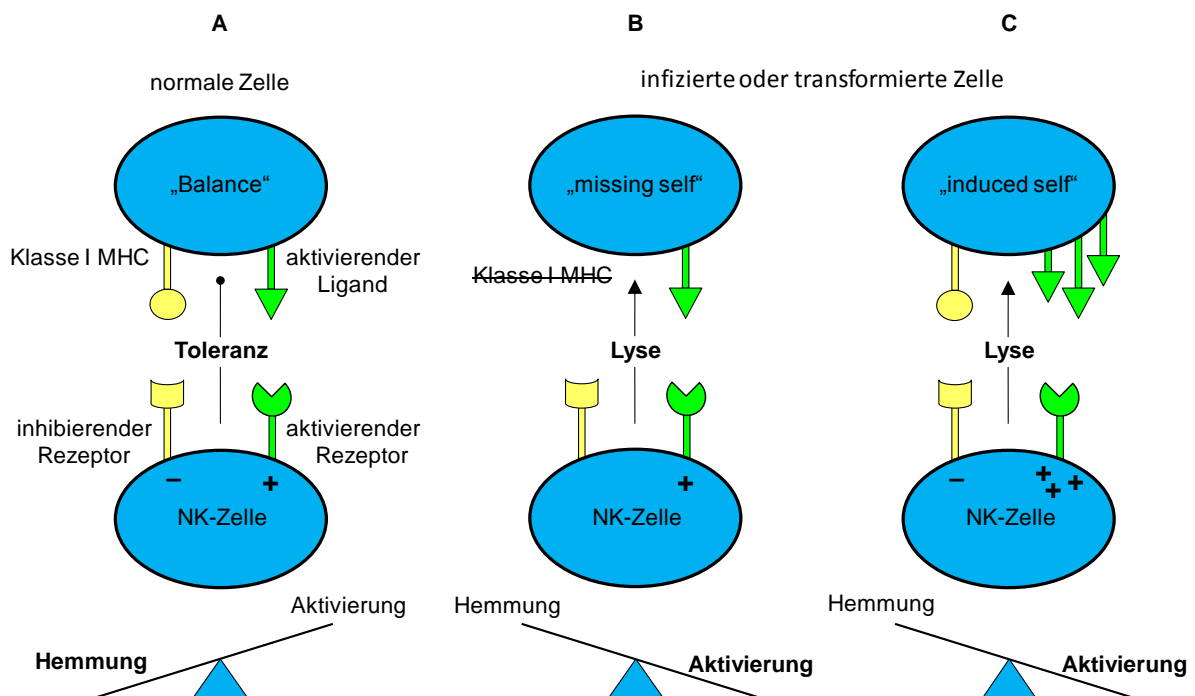


Abb. 2 „*Dynamic equilibrium concept*“. Durch Integration hemmender und aktivierender Einflüsse auf die NK-Zelle fällt die Entscheidung über die (A) Toleranz oder (B, C) Lyse der Körperzelle. Dabei kann sowohl eine fehlende Hemmung (B) als auch eine verstärkte Aktivierung (C) den Ausschlag zur NK-Zellaktivierung geben.

Dieses Modell betrachtet jedoch nur den letzten aller Schritte zur Aktivierung. Im Gegensatz zu den Zellen der myeloiden Reihe zeigen sich Natürliche Killerzellen als nicht vollständig zellautonom (Ferlazzo et al., 2004). Sie benötigen, neben der Balance von „missing self“ und „induced self“-Signalen, zusätzliche bahnende Stimuli, um in den Status der Aktivierbarkeit durch Targetzellen versetzt werden zu können. Die Rolle der Dendritischen Zellen und verschiedener Zytokine im Kontext der Tumorzellabstoßung ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.4 NK-Zellen und Dendritische Zellen im Crosstalk der Immunreaktion

Anhand der mannigfaltigen Rezeptoren und Erkennungsmechanismen, mit deren Hilfe Natürliche Killerzellen ihre Targetzellen identifizieren, wird deutlich, wie sehr die Entscheidung über Aktivierung oder Hemmung vom Zusammenspiel mehrerer Faktoren abhängig ist.

Zu diesen Faktoren zählen jedoch nicht nur Signale von potentiellen Targetzellen selbst. Das Milieu aus Zytokinen und modulatorischen Immunzellen, in dem sich die NK-Zellen bewegen, trägt einen entscheidenden Anteil zur Bahnung ihrer Effektormechanismen bei. Im Zentrum wichtiger Regulierungsmechanismen stehen dabei oft Dendritische Zellen. Für den speziellen Fall der Infektionsabwehr gilt: vor einer möglichen NK-Zell-Aktivierung, sprich der Freisetzung von IFN- γ und dem Erlangen voller zytotoxischer Kompetenz, steht das durch Dendritische Zellen vermittelte *Priming* der NK-Zelle. So konnte in Mäusen gezeigt werden, dass sesshafte NK-Zellen, einhergehend mit einem geringen zytotoxischen Potential, nur wenig Granzym B und Perforin speichern, die jeweilige mRNA allerdings schon vorhanden ist (Fehniger et al., 2007). Dieser Translationsblock kann erst durch den Schritt des NK-Zell-*Primings* aufgehoben werden. Dabei werden TLR⁺ Zellen durch mikrobiologische Antigene aktiviert und zur Sekretion von Typ-I-Interferonen stimuliert, die via Typ-I-Interferon-Rezeptor von Dendritischen Zellen erkannt werden. Die Folge ist eine Reifung der Dendritischen Zellen mit Expression und *trans*-Präsentation IL-15. Dieses bewirkt schließlich über direkten Zell-Zell-Kontakt das *Priming* der NK-Zellen (Lucas et al., 2007) und somit die Aufhebung des Translationsblocks. Erst durch diesen Mechanismus erlangen Natürliche Killerzellen ihre volle zytotoxische Kompetenz und werden fähig, nach der Targetzellerkennung durch aktivierende Liganden auf infizierten Zellen diese zu lysieren. Targetzell-Signale und *Priming*-auslösende Stimuli müssen dabei nicht identisch sein.

Neben IL-15 wirken auch andere von Dendritischen Zellen sezernierte Zytokine stimulierend auf NK-Zellen. Insbesondere IL-12 und IL-18 können zu einer Aktivitätssteigerung der NK-Zellen führen (Gerosa et al., 2002; Granucci et al., 2004; Yu et al., 2001). Dabei werden sogenannte Immunsynapsen gebildet, in denen es zu einer Polarisierung und lokalisierten Sekretion der Zytokine in den Intermembranraum beider Zellen kommt (Borg et al., 2004; Semino et al., 2005). Auch über Typ-I-

Interferone nehmen Dendritische Zellen Einfluss auf NK-Zellen und erreichen dabei insbesondere eine Steigerung der Zytotoxizität. Induziert wird diese in humanen NK-Zellen u.a. über eine Aufregulierung der NKG2D-Rezeptorexpression (Jinushi et al., 2003b).

Einem bidirektionalen Crosstalk entsprechend, haben Natürliche Killerzellen auch Einfluss auf Dendritische Zellen. Eine Ko-Kultur beider Zellen kann abhängig vom mengenmäßigen Verhältnis und dem Reifungsstand der Dendritischen Zellen sowohl deren Reifung als auch deren Apoptose auslösen (Piccioli et al., 2002). Auch hier ist ein direkter Zell-Zell-Kontakt notwendig, wobei TNF- α und dem NK-Zell-Rezeptor NKp30 zentrale Rollen in der Apoptoseinduktion zukommen (Ferlazzo et al., 2002). Dagegen scheint die Aufregulierung von HLA-E humane Dendritische Zellen vor der Lyse zu schützen (Della Chiesa et al., 2003). Die Lyse unreifer Dendritischer Zellen dient dabei möglicherweise der Schärfung und Sicherstellung optimaler adaptiver Immunmechanismen durch Unterdrückung einer potentiell inadäquaten CD4⁺-T-Zellaktivierung (Moretta et al., 2005).

Daneben lässt sich auch im Falle der Tumorzellabwehr eine Regulierung der NK-Zellen durch Dendritische Zellen und vice versa nachweisen. Eindrücklich wird hier die integrative Bedeutung dieses Kontaktes für die Verknüpfung von angeborenem und adaptivem Immunsystem erkennbar. Aufgrund der geringen Immunogenität von Tumorzellen ist die effiziente Initialisierung einer T-Zellantwort oft erschwert. Umso wichtiger erscheint hier das Zusammenspiel zwischen Dendritischen Zellen und NK-Zellen, die durch den Kontakt zur Proliferation, IFN- γ -Sekretion und Degranulation lytischer Enzyme angeregt werden (Ferlazzo et al., 2002). NK-Zellen besitzen durch die dargestellten Erkennungsmechanismen das einzigartige Potential, gerade auch schwach immunogene Zellen als pathologisch zu erkennen und eine Immunantwort in Gang zu setzen. Dabei stimulieren sie durch die Freisetzung von IFN- γ entweder zytotoxische T-Zellen direkt oder bewirken ebenfalls via IFN- γ eine weitere Reifung Dendritischer Zellen, die daraufhin IL-12 freisetzen und somit die CTL-Zellen aktivieren (Mocikat et al., 2003). Auch die IFN- γ -vermittelte Reifung von CD4⁺-T-Zellen zu Th1-Helferzellen in Lymphknoten konnte infolge des DC-NK-Crosstalks nachgewiesen werden (Martín-Fontecha et al., 2004). Eine erhöhte Tumorlyse durch NK-Zellen mit folgendem Freiwerden von Tumorantigenen bzw. deren gesteigerte Phagozytose und Präsentation durch Dendritische Zellen eröffnet einen weiteren Weg zur Verstärkung der gezielten Antitumorantwort durch CTL-Zellen (Degli-Esposti and Smyth, 2005). Diese Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem findet auch in umgekehrter Weise statt. So stimulieren reife Dendritische Zellen CD4⁺-T-Zellen, sodass diese wiederum NK-Zell-aktivierendes IL-2 freisetzen (van den Broeke et al., 2003).

Dendritische Zellen stellen so gemeinsam mit NK-Zellen einen entscheidenden Angelpunkt in der Koordination und gegenseitigen Verstärkung beider Arme des Immunsystems dar. Inwieweit Natürliche Killerzellen jedoch direkt aktivierbar oder auf eine vorausgehende Bahnung ihrer Aktivität

angewiesen sind, ist für viele Konstellationen unklar. Das infolge TLR-Stimulation nachgewiesene *Priming* im Rahmen der Infektionsabwehr lässt sich nicht direkt auf die Abstoßung von Tumorzellen übertragen, da in diesem Fall nicht klassische TLR-Liganden, sondern vielmehr apoptotische Zellen als initialer Stimulus anzusehen sind. Ob ein solcher Crosstalk zwischen Dendritischen Zellen und NK-Zellen auch im Rahmen der Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen eine Rolle spielt, die damit einhergehende mögliche Abhängigkeit von NK-Aktivierungsprozessen sowie die dabei freigesetzten Zytokine, sind Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

1.5 Das angeborene Immunsystem in der Tumorzellkontrolle

Tumorleiden gehören nach Erkrankungen des kardiovaskulären Systems zu den häufigsten Todesursachen in Deutschland (Statistisches Bundesamt Deutschland, 2009). Die klinische Manifestation eines Tumors stellt dabei aber nur den letzten von vielen Schritten dar. Man geht heute davon aus, dass Tumoren durch die Transformation einzelner weniger Zellen und deren anschließender stetiger Teilung entstehen. Zu den Charakteristika von Tumorzellen werden dabei unter anderem die genetische Instabilität, ihre Resistenz gegen programmierten Zelltod und die Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren gezählt (Hanahan and Weinberg, 2000). Ereignisse, die zu einer solchen Transformation führen, finden ständig im Körper statt. Dennoch führt nicht jede zelluläre Veränderung zwangsläufig zur Entstehung eines Tumors. Paul Ehrlich postulierte schon zu Beginn des 20. Jahrhunderts, dass es immunologische Mechanismen geben müsse, die solche veränderten Zellen erkennen und eliminieren, bevor es zur Entstehung größerer Mengen maligner Tochterzellen kommen kann (Ehrlich, 1909). Mit der Vermutung von Tumor-assoziierten Antigenen wurde schließlich die Theorie der *Tumorsurveillance*, d.h. der Kontrolle und Unterdrückung einer Tumorentstehung durch das Immunsystem, formuliert (Burnet, 1957). Im Umkehrschluss stellt die Kapazität, einer solchen Kontrolle zu entgehen, die entscheidende Voraussetzung zur Tumormanifestation dar (Hanahan and Weinberg, 2011).

Die Entstehung eines Tumors unter der Kontrolle des Immunsystems kann in drei Phasen unterteilt werden. Man spricht dabei von *Immunoediting* (Dunn et al., 2004b) (Abb. 3). In der ersten Eliminations-Phase erkennt das Immunsystem aberrante Zellen und initiiert deren Abstoßung. Dabei werden von den Tumorzellen selbst sowie von Stromazellen der Tumorumgebung und phagozytierenden Makrophagen stimulatorische Zytokine freigesetzt. Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Natürliche Killerzellen und primordiale T-Zell-Populationen (wie z.B. Natürliche Killer-T-Zellen und $\gamma\delta$ -T-Zellen), werden daraufhin aktiviert. Sie erkennen die veränderten Tumorzellen und leiten eine erste Abstoßungsreaktion ein. Durch die Lyse von Tumorzellen werden Antigene frei, welche wiederum von Dendritischen Zellen aufgenommen werden können. NK-Zellen fördern durch engen Kontakt deren Reifung und initiieren ihre Wanderung in drainierende

Lymphknoten. Dort kommt es durch die Dendritischen Zellen zur Präsentation von Tumorantigenen gegenüber naiven T-Zellen, woraufhin diese zur klonalen Expansion mit der Bildung antigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen (CTL) angeregt werden. Die CTL-Zellen finden daraufhin den Weg zurück zu den Tumorzellen und leiten eine weitere, noch spezifischere, Abstoßungsreaktion ein (Kim et al., 2007). Hat dieses Gegenpiel von Tumorzellen auf der einen und angeborenem wie adaptivem Immunsystem auf der anderen Seite Erfolg, so werden alle transformierten Zellen entfernt, ohne dass sich ein Tumor ausbilden kann. In diesem Fall entspricht diese erste Phase einer funktionierenden *Tumorsurveillance*.

Ist die Elimination jedoch unvollständig, so folgt die Equilibriums-Phase, in der sich die Neubildung von Tumorzellen und deren Abstoßung die Waage halten. Dabei steigt der Selektionsdruck auf die typischerweise genetisch instabilen Tumorzellen, sodass sich insbesondere solche Zellen herausbilden und überleben, die eine besonders geringe Immunogenität aufweisen. Diese Phase kann mehrere Jahre andauern, bis es unter Umständen zum Übergang in die letzte, die sogenannte Escape-Phase, kommen kann. Hier finden die Tumorzellen Wege, sich der Kontrolle des Immunsystems zu entziehen, um letztlich zu klinisch manifesten Tumoren heranzureifen (Dunn et al., 2004b).

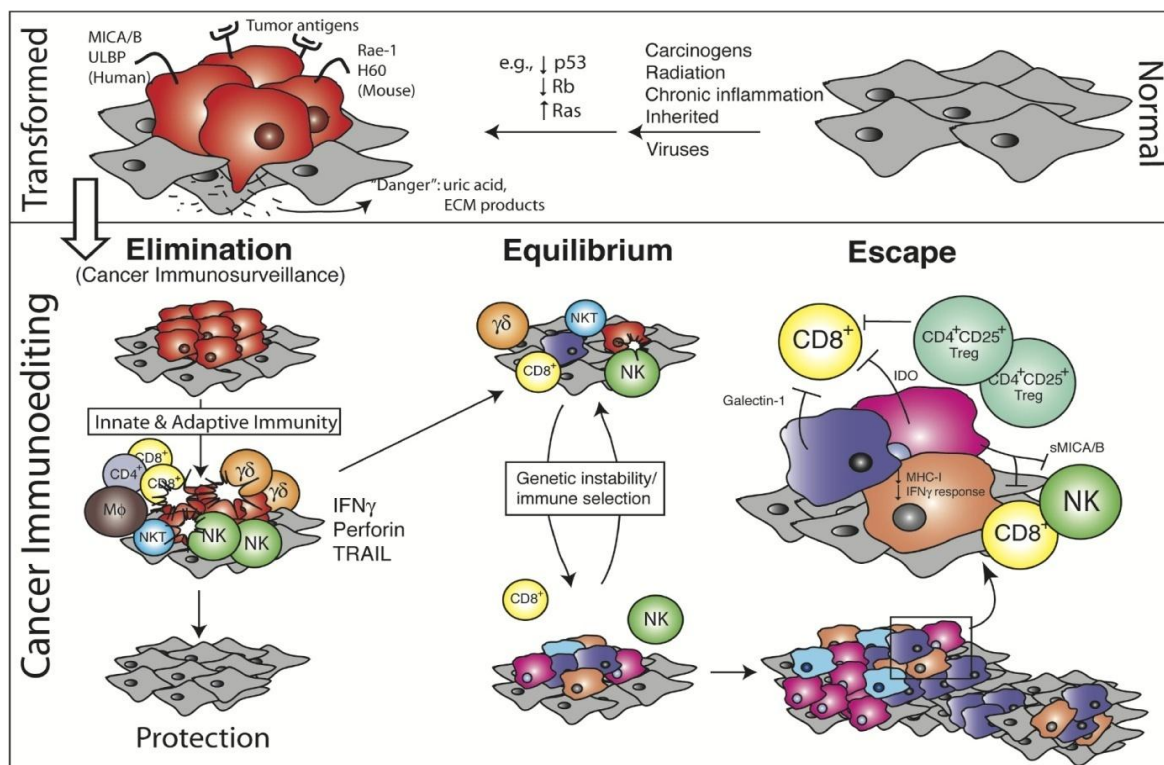


Abb. 3: Die drei Phasen des Tumor-Immunoediting. Gesunde Zellen (grau) erfahren infolge karzinogener Stimuli eine Transformation zu Tumorzellen (rot). Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems erkennen tumorspezifische Signale und initiieren daraufhin das *Tumor-Immunoediting*. Während der ersten Eliminations-Phase gelingt es dem Immunsystem, Tumorzellen zu zerstören und den Organismus vor einer Tumorentstehung zu schützen. Ist dieser Prozess nicht erfolgreich, so erreichen die Tumorzellen die Equilibriums-Phase, in der sich Tumorzellabstoßung und -neubildung die Waage halten, während sich stets immunologisch neue Tumorvarianten bilden. Diese Tumorvarianten können unter Umständen die Kontrolle des Immunsystems unterlaufen und in der Escape-Phase zu klinisch manifesten Tumoren heranwachsen (modifiziert nach Dunn et al. (Dunn et al., 2004a)).

Mechanismen, die Kontrolle des Immunsystems zu unterlaufen, werden als *Immune-Escape* bezeichnet (Dunn et al., 2004b). Eine zentrale Rolle spielt dabei die jeweilige Immunogenität der Tumorzellen. Tumor-assoziierte Antigene werden von den aberranten Zellen via Klasse I MHC-Molekülen auf deren Oberfläche präsentiert. Zytotoxische T-Zellen erlangen so die Möglichkeit, diese Zellen als verändert zu erkennen und deren Abstoßung einzuleiten. Entsprechend den Regeln der natürlichen Selektion werden so jedoch diejenigen Zellen gefördert, die sich aufgrund reduzierter MHC-Expression der T-Zell-Kontrolle entziehen können (Shankaran et al., 2001). Ein solcher Verlust an Klasse I MHC kann in vielen humanen Tumoren beobachtet werden und geht durch die geringere Immunogenität oft mit einer gesteigerten Malignität einher (Reiman et al., 2007). Genau dieser Verlust an Klasse I MHC-Komplexen ist es aber auch, der transformierte Zellen anfälliger gegenüber einer Lyse durch Natürliche Killerzellen macht. Die Zellen des angeborenen Immunsystems können auf diese Weise genau dort angreifen, wo Tumorzellen dem Einfluss des adaptiven Immunsystems entgehen. Tatsächlich stellt der Verlust von Klasse I MHC in manchen Tumoren ein Merkmal niedrigerer Aggressivität und besserer Prognose dar (Madjd et al., 2005; Ramnath et al., 2006). Wie sich die Veränderung der MHC-Moleküle einer Tumorzelle auf ihre Malignität auswirkt, ist durch die Komplexität der verschiedenen Einflüsse schwer vorherzusehen. Vermutet wird aber, dass insbesondere Zellen mit geringer, jedoch nicht vollständig unterbundener Klasse I MHC-Expression, einen *Immune-Escape* erreichen, da sie weder von zytotoxischen T-Zellen noch von Natürlichen Killerzellen optimal erkannt bzw. abgestoßen werden können (Reiman et al., 2007).

Daneben dienen auch andere Mechanismen einem Unterlaufen der *Tumorsurveillance*. Hierzu zählen unter anderem die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF- β (Kim et al., 2007) und gegenüber tumorspezifischen T-Zellen die Induktion ihrer Apoptose durch Expression von FasL oder das Erreichen einer Anergie durch verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle (Wilczyński and Duechler, 2010).

So stellt die Entstehung von Tumoren ein komplexes Gegenspiel von Kontroll- und Escape-Mechanismen dar, bei dem die Zellen des angeborenen Immunsystems insbesondere in der frühen Tumorabwehr und gegenüber transformierten Zellen mit geringer Immunogenität eine bedeutende Rolle spielen.

1.6 Fragestellung und Signifikanz der Arbeit

Neben dem je nach Typ der Infektion oder Tumorzellart variierenden Muster an aktivierenden Natürlichen Killerzell-Liganden stellt der Wegfall ihrer Hemmung durch Klasse I MHC-Verlust einen grundlegenden verbindenden Mechanismus dar, der es bedarf, separat von anderen Einflüssen untersucht zu werden. Im Gegensatz zum beschriebenen Szenario der Infektionsabwehr ist die Signalkaskade im Falle einer *In-vivo*-Abstoßung von Tumorzellen bzw. Zellen mit einem solchen „missing self“ als alleinigem Target-Signal bis dato weitestgehend unbeleuchtet. Die Notwendigkeit einer NK-Zell-Vorstimulation (*Priming*) zur effizienten *In-vitro*-Lyse von Klasse I MHC-negativen Tumorzellen lässt aber darauf schließen, dass NK-Zellen auch hier nur nach vorherigen Bahnungsprozessen ihre vollständige Effektorkompetenz erlangen können. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Notwendigkeit solcher vorausgehenden Prozesse zu bestätigen sowie daran beteiligte kritische Faktoren zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Hypothese experimentell getestet, dass auch die Erkennung von Klasse I MHC-defizienten Zellen (Tumorzellen und nicht-transformierte Milzzellen) durch NK-Zellen ein *Priming* durch Dendritische Zellen voraussetzt. Weiterhin wurden die Zytokinsignale untersucht, die für eine optimale NK-Zell-medierte Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten „Selbst“-Zellen benötigt werden. Dies sind signifikante Studien, die neue Zielstrukturen zur nachhaltigen Aktivierung von NK-Zellen aufzeigen und so in zukünftigen immuntherapeutischen Strategien gegen Tumoren Anwendung finden könnten.

Die Entschlüsselung solcher grundlegender Mechanismen stellt die notwendige Basis dar, auf der insbesondere im Bereich der onkologischen Forschung weiterführende Arbeiten aufbauen können. Je detaillierter die Mechanismen der immunologischen Abwehr von Tumorzellen verstanden werden, desto größer ist die Chance, neue Therapieansätze gegen neoplastische Krankheiten zu finden und diese als natürliche Antitumorstrategien in die klinische Verwendung zu übertragen (Terme et al., 2008). Gerade im Bereich der NK-Zell-Forschung lässt der aktuelle Wissensstand auf weitere Fortschritte in der Therapie hämatologischer Neoplasien sowie insbesondere auch der Vermeidung von Graft-versus-Host-Reaktionen (GvHD) nach Knochenmarktransplantation hoffen (Cooley and Weisdorf, 2010).

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Durchflusszytometer: FACS Canto II	BD, Heidelberg, Deutschland
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen, Deutschland
Gefrierschrank -21°C: Premium	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80°C: Hera freeze	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank 4°C: gastro line	Liebherr, Bulle, Schweiz
Mikroskop: Axiovert 25	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe: Pipetboy	IBS Integra Bioscience, Zizers, Schweiz
Pipetten bis 1000 µl: Pipetman Classic	Gilson, Middleton, USA
Schüttelinkubator: Certomat IS	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Sterilbank: Hera Safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer: MS1 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland
Zellinkubator: BBD 6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge: Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

FACS Analyse Tubes: round bottom, 5 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Injektionsspritzen 1 ml, 26 G x ½	BD Heidelberg, Deutschland
Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml Stripette	Corning Incorporated, Corning, USA
Pipettenspitzen: 10; 200; 1000 µl TipOne	STARLAB GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Polypropylen Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reaktionsröhrchen: Falcon 50 ml, 15 ml	BD, Heidelberg, Deutschland
Serumpipetten: 153 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Skalpell Nr. 10	Feather Safety Razor Co, Ltd, Osaka, Japan
Spritzen: Injekt Solo 2 ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Wellplatten: 96 Microwell F, C, U bottom	Nunc, Roskilde, Dänemark
Wellplatten: Multidish 6 well, 12 well	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturflaschen: EasyFlasks	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellsieb: Cell strainer 70 µm, Nylon	BD, Heidelberg, Deutschland

2.1.3 Chemikalien

5-, 6-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, Steinheim, Deutschland
⁵¹ Chrom Na ₂ CrO ₄	MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland
Anti Asialo GM1 (Kaninchen)	Wako, Osaka, Japan
Brefeldin A	Sigma, Steinheim, Deutschland
Concanavalin A	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Cytofix / Cytoperm	BD, Heidelberg, Deutschland
Diphtherie-Toxin (DT)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	Serva, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich
Gentamycin (10 mg/ml)	Cambrex, Walkerville, USA
HBSS (+ Ca ²⁺) (Hank's balanced salt solution)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
HEPES (1%)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ionomycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott, Wiesbaden, Deutschland
Kaliumbicarbonat, KHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ketamin (Ketanest®-S)	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	Sigma, Steinheim, Deutschland
Lympholyte®-M	Cedarlane, Hornby, Canada
Natrium-Pyruvat (1%)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Nicht essentielle Aminosäuren	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
PBS (Phosphate buffered saline)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin (10000 U/ ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Polyinosinic:polycytidylic acid (poly(I:C))	Sigma, Steinheim, Deutschland
Saponin	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Streptomycin (10000 U/ ml)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Bayer, Leverkusen, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Steinheim, Deutschland

2.1.4 Enzyme

Collagenase D	Roche, Mannheim, Deutschland
DNase	Roche, Mannheim, Deutschland

2.1.5 Antikörper

<u>Antigen</u>	<u>Klon</u>	<u>Isotyp</u>	<u>Konjugation</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Bezugsquelle</u>
CD11c	N418	IgG (Hamster)	PE	1:500	eBioscience
CD3	145-2C11	IgG1, κ (Hamster)	APC	1:100	eBioscience
CD45 (Ly-5)	30-F11	IgG2b, κ (Ratte)	PE-Cy7	1:100	eBioscience
IFN-γ	XMG1.2	IgG1, κ (Maus)	APC	1:100	eBioscience
MHC-I (H2-D ^b)	28-148	IgG2a, κ (Maus)	Biotin	1 :400	BD Pharming
MHC-II (I-A/I-E)	2G9	IgG2a, κ (Ratte)	Biotin	1 :1000	BD Pharming
NK 1.1	PK 136	IgG2a, κ (Maus)	PE	1:100	BD Pharming
<u>Interaktionspartner</u>	<u>Protein</u>				
Biotin		Streptavidin	PerCP	1 :600	BD Pharming

2.1.6 Fluorochrome

<u>Fluorochrom</u>	<u>Funktion</u>	<u>Absorptions- / Emissionsmaximum [nm]</u>
APC	Kopplung an monoklonale AK	650 / 661
CFSE	Intrazelluläre Färbung	492 / 518
DAPI	Färbung der DNA toter Zellen	358 / 461
PE	Kopplung an monoklonale AK	490, 565 / 575
PE-Cy7	Kopplung an monoklonale AK	496, 546 / 785
PerCP	Kopplung an Streptavidin	490 / 678

2.1.7 Software

Excel 2007	Microsoft, Redmond, USA
FACS Diva Ver. 5.0.3	BD, Heidelberg, Deutschland
FlowJo Ver.6.4.1	Tree Star, Inc. Stanford, USA
Powerpoint 2007	Microsoft, Redmond, USA
Word 2007	Microsoft, Redmond, USA

2.1.8 Puffer und Kulturmedien

DMEM 10⁺-Kulturmedium

<u>Anteil</u>	<u>Zusammensetzung</u>
500 ml	Dulbecco's modified Eage'l's medium (DMEM)
10 % (50 ml)	Fetales Kälberserum (FCS)
1 % (5 ml)	Natrium-Pyruvat
1 % (5 ml)	HEPES
1 % (5 ml)	nicht essentielle Aminosäuren
2,5 % (13 ml)	Mediumzusätze:
4 g	L-Glutamin
100 ml	Penicillin (10.000 U/ml)
	Streptomycin (10.00 mg/ml)
20 ml	Gentamycin (10 mg/ml)
69 µl	β-Mercaptoethanol (98 %)
ad 500 ml	ddH ₂ O

PBS

137 mM	NaCl
2,7 mM	KCl
8 mM	Na ₂ HPO ₄
1,5 mM	KH ₂ PO ₄

FACS-Puffer

in	PBS
2,5 %	Fetales Kälberserum (FCS)
2 mM	EDTA

Saponin-Puffer

in	PBS
2 %	Fetales Kälberserum (FCS)
0,5 %	Saponin

Erythrozyten-Lyse-Puffer

in	ddH ₂ O
150 mM	NH ₄ Cl
10 mM	KHCO ₃
100 µM	EDTA (0,5 M)

2.1.9 Zelllinien

<u>Zelllinie</u>	<u>Ursprungsgewebe</u>	<u>Referenz</u>
YAC-1	Lymphomzellen (Maus)	(Kiessling et al., 1975)
RMA	RBL-5 T-Lymphomzellen (Maus)	(Kärre et al., 1986)
RMA-S	RBL-5 T-Lymphomzellen (Maus)	(Kärre et al., 1986)
RMA-S-H60-Ova	RMA-S Lymphomzellen (Maus)	(Diefenbach et al., unveröffentlichte Daten)

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen bei 37°C und 5% CO₂-Anteil in DMEM 10⁺ Kulturmedium gezüchtet. Im Rahmen der Abstoßungsuntersuchungen mit RMA-S-Zellen wurden regelmäßig durchflusszytometrische Kontrollen auf Verlust der Klasse I MHC-Expression durchgeführt.

Bei den verwendeten RMA-S-H60-Ova-Zellen wurde neben dem NKG2D-Liganden H60 zusätzlich Ovalbumin an die RMA-S-Zellen gekoppelt. Da letzteres vorwiegend in der T-Zell-Immunologie verwendet wird und im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine experimentelle Bedeutung besitzt, werden die Zellen im Folgenden kurz als RMA-S-H60 bezeichnet.

2.1.10 Versuchstiere

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden für die Dauer der Versuche unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen gehalten und hatten Zugang zu Trinkwasser und Standardnahrung ad libitum. Soweit möglich wurden in den Experimenten Tiere im Alter von 6 bis 12 Wochen eingesetzt. Im Folgenden aufgeführt sind die eingesetzten Inzuchtstämme mit jeweiliger Bezugsquelle und Referenz. Es wurden ausschließlich auf C57BL/6 Hintergrund generierte Knockoutmäuse verwendet.

<u>Mausstamm</u>	<u>Bezugsquelle</u>	<u>Referenz</u>
Wildtyp C57BL/6	Charles River Breeding Laboratories, Sulzfeld	
<i>B2m</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Zijlstra et al., 1989)
CD11cDTR ^{Tg}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Jung et al., 2002)
<i>Jα18</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Cui et al., 1997)
<i>Ifnar</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Müller et al., 1994)
<i>Ifnb1</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Erlandsson et al., 1998)
<i>Ifng</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Dalton et al., 1993)
<i>Ifngr1</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Huang et al., 1993)
<i>IL12p35</i> ^{-/-} / <i>p40</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Ehlers et al., 2005)
<i>Prf1</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Kägi et al., 1994)
<i>Ticam1</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Akazawa et al., 2007)
<i>Tlr9</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Hemmi et al., 2000)
<i>Tnf</i> ^{-/-}	Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Freiburg	(Körner et al., 1997)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellzählung

Um die Anzahl an lebenden Zellen in einer Zellsuspension zu bestimmen, wurden dieser 10 µl entnommen und in 90 µl PBS suspendiert. Hieraus wurden wiederum 10 µl entnommen und zum Anfärben avitaler Zellen in 90 µl Trypanblau suspendiert. Zum Zählen wurde ein Tropfen dieser Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und im Mikroskop die Menge lebender, d.h. nicht angefarbter, Zellen aus den vier Großquadranten ausgezählt. Der Mittelwert der vier Zählergebnisse ergibt die Anzahl der Zellen in Millionen pro Milliliter Zellsuspension.

2.2.2 Organe wiegen

In dieser Arbeit wurde das Gewicht von Lunge und Leber bestimmt. Die Organe wurden dabei im Ganzen dem Situs entnommen und zur Vermeidung einer Austrocknung während der Entnahme weiterer Organe in DMEM 10⁺-Medium gelagert. Ohne weitere Behandlung konnte, nach Abtropfen überschüssiger Flüssigkeit, das individuelle Gewicht des Organs mithilfe einer kalibrierten Feinwaage festgestellt werden.

2.2.3 *In-vivo*-Stimulation von NK-Zellen

Zur Stimulation von NK-Zellen im Rahmen der Bestimmung ihrer *In-vitro*-Aktivität gegenüber verschiedener Targetzellen wurden C57BL/6 Mäusen, 16 Stunden vor Isolation der Milzzellen, intraperitoneal 100 µg poly(I:C) (gelöst in 500 µl PBS) verabreicht. In einem weiteren Versuch wurden zur Stimulation Milzzellen aus *B2m*^{-/-}-Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund isoliert und als Suspension mit 6 Millionen Zellen pro 250 µl PBS ebenfalls intravenös verabreicht.

2.2.4 ⁵¹Chrom-Freisetzungssassay

Eine Möglichkeit, die Aktivierung von NK-Zellen zu überprüfen, stellt die Messung ihrer direkten Effektorfunktion in Form von Zelllyse dar. Dabei wird die Menge an Targetzellen gemessen, die von einer definierten Menge an NK-Zellen lysiert wird. Die Lyse wird quantifiziert durch die Tatsache, dass zuvor aufgenommenes Chrom von lysierten Zellen wieder freigesetzt wird. Je höher die Konzentration an Chrom im Medium, desto höher daher die Lyse an Targetzellen.

Als Targetzellen dienten Milzzellen von *B2m*^{-/-}-Mäusen sowie in Zellkultur gezüchtete YAC-1-, RMA-, RMA-S und RMA-S-H60-Zellen. Die Zellen wurden zur Aufnahme des Isotops für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ mit ⁵¹Chrom inkubiert. Es folgte dreimaliges Waschen in DMEM 10⁺-Medium mit anschließender Resuspension in selbigem. Da für diese Untersuchung ein genaues Verhältnis von

Zielzellen zu Effektorzellen notwendig ist, wurden homogenisierte Milzzellen auf CD3 und NK1.1 gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. Die Menge an CD3 negativen und NK1.1 positiven Zellen stellt definitionsgemäß die Menge an NK-Zellen in der Zellsuspension dar. Mit diesem Ausgangswert wurde eine Verdünnungsreihe der Effektorzellen erstellt. Es konnten jeweils Triplet-Ansätze für die Effektor- : Targetzellverhältnisse von 0,2:1, 0,6:1, 2:1 und 6:1 (letzere nur gegenüber RMA- und RMA-S-Zellen) erstellt werden. Die Ansätze wurden jeweils auf ein Endvolumen von 200 µl eingestellt.

Nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen bei 300 rpm für eine Minute abzentrifugiert. Vom Überstand wurden jeweils, unter besonderer Beachtung keine Zellen mit aufzunehmen, 100 µl abgenommen. Das Ausmaß der Lyse ließ sich jeweils an der Höhe der radioaktiven Aktivität im Überstand, sprich der aus den Zellen ins Medium übergetretenen Isotope, messen (experimentelle Lyse). Die Grundlage zur Berechnung der spezifischen Lyse stellt folgende Formel dar:

$$\text{spezifische Lyse (\%)} = \frac{\text{experimentelle Lyse [cpm]} - \text{Spontanfreisetzung [cpm]}}{\text{maximale Lyse [cpm]} - \text{Spontanfreisetzung [cpm]}} \times 100$$

Als Referenzwert zur Spontanfreisetzung diente der Wert aus 100 µl Überstand eines Zellansatzes mit ausschließlich Targetzellen, d.h. ohne Effektorzellen und zellulärem Lysevorgang. Als maximale Lyse wurde der Wert von 50% der Targetzellen verwendet.

2.2.5 Interferon-γ-Freisetzungssassay

Zur Durchführung des Interferon-γ-Freisetzungssassays wurden in einer 96-Well-Rundbodenplatte je eine Millionen Targetzellen mit der gleichen Menge an Milzzellen in insgesamt 200 µl DMEM 10⁺ suspendiert. Als Targetzellen dienten im Parallelansatz die T-Lymphomzelllinien RMA, RMA-S, RMA-S-H60 und YAC-1. Zur Gewinnung der Milzzellen wurde die Milz von unbehandelten C57BL/6-Mäusen gewonnen und mittels Siebpräparation mit einem Cellstrainer in DMEM 10⁺ homogenisiert und anschließend durch einminütige Inkubation in Erythrozyten-Lyse-Puffer von Erythrozyten befreit.

Die Ansätze aus Milzzellen und Targetzellen wurden mit Brefeldin A in einer Endkonzentration von 10 µg/ml versetzt. Der Zusatz dient dem Verbleib des produzierten Zytokins innerhalb der Zelle, da freigesetztes Interferon keiner bestimmten Zelle zugeordnet werden könnte.

Als Positivkontrolle wurde in jedem Assay eine Ansatzreihe mit Zusatz von PMA und Ionomycin mitgeführt. In einer Endkonzentration von 50 ng/ml PMA und 750 ng/ml Ionomycin führt diese Kombination zu einer starken Aktivierung von NK-Zellen.

Nach Inkubation für 5 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Ansätze für 3 Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert und einmalig in FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden daraufhin auf CD3 mittels FITC-Antikörper und auf NK1.1 mittels PE-Antikörper gefärbt. Um das intrazelluläre Interferon- γ zu färben, wurden die Ansätze zweimalig in Saponinpuffer gewaschen und mit ebenfalls in Saponinpuffer gelöstem APC-Antikörper gefärbt. Nach jeweils zwei Waschgängen in Saponinpuffer und FACS-Puffer wurden die Zellansätze in 150 μ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Als aktivierte NK-Zellen wurden dabei alle APC positiven Zellen betrachtet, welche zugleich die Kriterien der NK-Zellen (CD3 negativ, NK1.1 positiv) erfüllten. Das Ergebnis wurde als Anteil aktivierter NK-Zellen am Gesamtanteil der NK-Zellen angegeben.

2.2.6 *In-vivo*-Depletion Natürlicher Killerzellen

Zur Depletion Natürlicher Killerzellen wurden zwei Methoden angewandt. Entweder wurde Mäusen je 200 μ g eines NK1.1-Antikörpers (PK136) (Seaman et al., 1987) oder 25 μ l eines Asialo-GM1 Antiserums (Kasai et al., 1980) intraperitoneal verabreicht. Die Injektion fand stets 24 Stunden vor Injektion CFSE-markierter Donorzellen statt und wurde durchflusszytometrisch nach Antikörperfärbung auf NK1.1⁺ / CD3⁻ Milzzellen auf ihre Wirksamkeit kontrolliert.

2.2.7 *In-vivo*-Depletion Dendritischer Zellen

Entsprechend des Mausmodells von Jung et al. (Jung et al., 2002) wurde Mäusen zur Depletion von CD11c⁺-Zellen 24 Stunden vor Gabe CFSE-markierter Donorzellen je 100 ng Diphtherie-Toxin (gelöst in 100 μ l sterilem H₂O) intraperitoneal injiziert. Die Kontrolle der Depletion fand via Durchflusszytometrie nach Antikörperfärbung auf CD11c⁺- und Klasse II MHC⁺-doppelt-positive Zellen in der Milz statt.

2.2.8 *In-vivo*-Abstoßungsassay

2.2.8.1 *Aufbereitung von Donor-Milzzellen und T-Lymphomzellen*

Donor-Mäuse wurden vor Organentnahme stets durch Isofluran (Forene®) betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet, um nach Desinfektion und Eröffnung des Abdomens deren Milz entnehmen zu können. Die Organe wurden anschließend zur Erzeugung eines Gewebehomogenats

durch ein Zellsieb (Nylon, 70 μm) gedrückt. Die unter Nachspülen mit DMEM 10⁺ entstandene Zellsuspension konnte nach Abzentrifugation (1500 rpm für 3 Min) zur Elimination der Erythrozyten in 1 ml Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für eine Minute inkubiert werden. Nach folgendem Waschen in PBS standen die so gewonnenen Milzzellen als Donorzellsuspension zur Injektion bereit.

Für Versuche mit RMA- und RMA-S-Lymphomzellen konnten die Zellen direkt aus ihrer Flüssigkultur abzentrifugiert werden.

2.2.8.2 CFSE-Markierung von Donor-Zellen

Die mit Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester (CFSE) zu markierenden Zellen wurden in PBS aufgenommen, ausgezählt und auf eine Konzentration von 1×10^7 Zellen pro Milliliter eingestellt. Zellsuspensionen für eine CFSE^{high}-Markierung (*B2m*^{-/-}-Milz- bzw. RMA-S-Lymphomzellen) wurden mit einer Konzentration von 5 μM , Zellsuspensionen für eine CFSE^{low}-Markierung (*B2m*^{+/+}-Milz- bzw. RMA-Lymphomzellen) mit einer Konzentration von 0,5 μM CFSE versetzt. Nach zehn Minuten Inkubation bei 37°C und 5% CO₂-Anteil wurde die Färbereaktion durch Zugabe eines der Zellsuspension gleichen Volumenanteils an mit 10% FCS versetztem DMEM 10⁺ gestoppt. Die Zellsuspensionen wurden im Anschluss zweimal mit PBS gewaschen und auf eine Endkonzentration von 1×10^7 pro 100 μl eingestellt. Es folgte die Kombination jeweils *high*- und *low*-CFSE-markierter Zellsuspensionen im Verhältnis 1:1. Vor Injektion wurden die Suspensionen mittels Durchflusszytometrie auf eine ausreichende Differenzierbarkeit des CFSE-Signals sowie das ausgeglichene Mischungsverhältnis beider Zellanteile überprüft.

2.2.8.3 Intravenöse Injektion von Donorzellen

In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur intravenösen Injektion angewandt. Zellen wurden entweder retrobulbär (Untersuchungen mit *B2m*^{-/-}-Milzzellen) oder via Schwanzvene (Untersuchungen mit T-Lymphomzellen) dem venösen System zugeführt. Vergleichende Untersuchungen ergaben keine Unterschiede bezüglich der erreichten Zellzahlen in den untersuchten Organen, sodass beide Methoden als gleichwertig anzusehen sind.

Zur retrobulbären Injektion wurden die Akzeptor-Mäuse mittels einer Narkoselösung aus 57,5% ddH₂O, 40% (S)-Ketamin (Ketanest® S) und 2,5% Xylazin (Rompun®) betäubt. Nach Einsetzen der Narkosewirkung wurde die Injektionskanüle medial des Augapfels eingeführt und unter Beibehalten dieser Position langsam 200 μl der Zellsuspension injiziert. Die Zellen gelangten auf diese Weise über den hinter dem Augapfel befindlichen Venenplexus in das Gefäßsystem der Maus. Zur intravenösen

Injektion über die Schwanzvene wurden die Mäuse zuvor mit einer Rotlichtlampe zwecks Erweiterung des Gefäßsystems erwärmt. Die zu injizierende Maus wurde daraufhin in einem Tubus aus Plexiglas platziert, welcher am Ende eine Öffnung für den Schwanz aufweist, sodass dieser für die Injektion gut zugänglich wird. Die Kanüle wurde in spitzem Winkel in eine der drei großen Schwanzvenen eingeführt und 200 µl der Suspension langsam dem venösen System zugeführt.

2.2.8.4 *Isolation lienaler Zellen und Depletionskontrolle Anti-NK1.1-blockierter NK-Zellen im B2m^{-/-}-Abstoßungsassay*

Am Tag 3 nach Donorzell-Injektion wurden die mit B2m^{-/-}-Milzzellen injizierten Mäuse mit Isofluran (Forene®) betäubt und durch zervikale Dislokation getötet. Deren Milze wurden entnommen und mittels Netzpräparation (Nylon, 70 µm) als Gewebehomogenat zur Erythrozytenlyse (1 Minute in Erythrozyten-Lyse-Puffer) vorbereitet. Die so gereinigten Milzzellen standen resuspendiert in 150 µl FACS-Puffer für die Analyse im Durchflusszytometer bereit.

Zur Kontrolle einer erfolgreichen Depletion der NK-Zellen in den mit NK1.1-Antikörpern vorbehandelten Mäusen wurden deren, wie oben beschrieben, präparierten Milzzellen vor der Analyse im Durchflusszytometer zusätzlich mittels Antikörperfärbung markiert. Zur Färbung wurden PerCP-markierte CD3- (1:100) und APC-markierte NK1.1-Antikörper (1:400) verwendet.

2.2.8.5 *Isolation und Färbung pulmonaler Lymphozyten im RMA-S-Abstoßungsassay*

Gemäß der Versuchsplanung wurden die Mäuse nach einem vorgegebenen Zeitintervall (2 bis 24 Stunden) getötet, um die Lymphozyten bzw. injizierten Lymphomzellen aus der Lunge isolieren zu können. Dazu wurden die Mäuse stets vorab durch Isofluran (Forene®) betäubt und anschließend mittels zervikaler Dislokation getötet.

Die Haut an der Bauchseite wurde mit 70% Ethanol desinfiziert und daraufhin über dem Thorax eröffnet. Das nun freiliegende Sternum wurde durchtrennt, sodass ein freier Zugang zu den thorakalen Organen entstand. Das Lungenpaket konnte als Ganzes entnommen werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass Herz und Thymus in situ belassen oder direkt im Anschluss vom Lungengewebe entfernt wurden. Während der Entnahme der Lungen weiterer Versuchsmäuse wurden bereits entnommene Lungen in DMEM 10⁺ gelagert.

Die Lungen wurden im Anschluss mithilfe einer feinen Schere in ca. 1 bis 2 mm kleine Stücke zerteilt und für eine Stunde bei 37°C unter sachter Rotation im Schüttelinkubator verdaut. Als Verdauungslösung

dienten je Lunge 5 ml HBSS (+ Ca²⁺), versetzt mit jeweils 1:100 DNase und Collagenase D. Die Reaktion wurde durch Zugaben von je 50 µl EDTA (0,5 molar) gestoppt.

Um ein Gewebehomogenat zu erhalten, wurden die zerkleinerten Lungen durch ein Zellsieb (Nylon, 70 µm) gedrückt und durch Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 Minuten von der Verdauung getrennt. Zur Elimination der Erythrozyten wurden die Pellets in 1 Milliliter Erythrozyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für eine Minute inkubiert.

Zur Extraktion der Lymphozyten wurde ein Gradientenverfahren angewendet. Die in 4 ml PBS resuspendierten Pellets wurden in einem Reaktionsröhrchen mit 3 ml Lympholyte® unterschichtet. Nach Zentrifugation für 20 Minuten bei 1200 g in Raumtemperatur und ohne Bremsfunktion der Zentrifuge (d.h. freies Auslaufen des Rotors nach Ablauf der Zeit) konnte die entstandene Interphase mittels Serumpipetten entnommen, in ein neues Reaktionsröhrchen überführt und das Zellpellet nach Abzentrifugation und Waschen in DMEM 10⁺ zur Antikörperfärbung in 96-Well-Platten übernommen werden.

Zur Färbung wurde PE-Cy7 markierter CD45-Antikörper in FACS-Puffer 1:100 verdünnt und jeweils 50 µl dieser Färbelösung zu den Ansätzen zugegeben. Nach Inkubation für 12 Minuten bei 37°C und 5% CO₂-Anteil wurden die Ansätze zweimal in 150 µl FACS-Puffer gewaschen und zur Durchflusszytometrie in 150 µl FACS Puffer resuspendiert.

2.2.8.6 Funktionsweise: Lympholyte Gradient

Nach Entnahme eines Organs finden sich in der Zellsuspension neben den hier bedeutsamen Lymphozyten auch alle anderen Zellen und Gewebekomponenten, die sich zur Zeit der Präparation im Organ befanden. Eine zu hohe Kontamination mit nicht relevanten Zellen stört jedoch den weiteren experimentellen Ablauf, wie z.B. die Antikörper-Färbung und die anschließende Analyse im Durchflusszytometer. Es ist daher sinnvoll, die Lymphozyten in einem Trennverfahren zu selektieren. Hier macht man sich die unterschiedliche Dichte der einzelnen Zellen zu Nutze. Im sogenannten „Dichte-Gradientenverfahren“ wird die inhomogene Zellsuspension von einem sterilen und isotonen Gemisch aus Polysucrose und Natriumdiatrizoat (Lympholyte®) unterschichtet. Die Dichte dieses Gemisches unterscheidet sich von derjenigen der Trägerlösung der Zellsuspension (in diesem Fall PBS). Unter Zentrifugation trennen sich die Bestandteile der Zellsuspension nach spezifischer Dichte auf. Im Resultat findet sich am Boden des Probenröhrchens ein Pellet. Dieses beinhaltet insbesondere tote Zellen und Erythrozyten, die im Verlauf der Zentrifugation das Lympholyte®-Gemisch durchwandern konnten. Auf dem Gemisch schwimmt der Großteil der mononukleären Zellen und bildet je nach Menge eine mehr oder weniger ausgeprägte Interphase an

der Grenze zum zu oberst aufliegenden Trägermedium der Zellsuspension. Laut Herstellerangaben kann auf diese Weise eine Reinheit von über 70% vitaler Lymphozyten in der Interphase erreicht werden. Darin enthalten sind jedoch weiterhin andere mononukleäre Zellen wie Monozyten oder Makrophagen. Neben der Selektion von Lymphozyten aus Organsuspensionen eignet sich diese Methode auch zur Reinigung lymphozytärer Zellkulturen von toten Zellen.

2.2.9 Grundlagen: Durchflusszytometrie

Zellsuspensionen können mittels Durchflusszytometrie auf ihre morphologischen Eigenschaften analysiert werden. Dabei werden die Zellen einzeln und in kontinuierlichem Fluss durch einen Laserstrahl geleitet. Dieser wird dadurch charakteristisch abgelenkt, sodass Rückschlüsse auf Größe und Granularität jeder Zelle ermöglicht werden. Darüber hinaus kann die Fluoreszenz von zuvor entsprechend markierten Zellen detektiert und somit das phänotypische Zellbild weiter spezifiziert werden (Abb. 4).

Lymphozyten ähneln sich in ihrem äußerlichen Erscheinungsbild sehr. Es handelt sich um relativ kleine Zellen mit dichtem Kern und wenig Zytoplasma. Für die Differenzierung der Subpopulationen ist eine Betrachtung von individuellen Zellmarkern nötig. B-Zellen exprimieren klassischerweise CD19, T-Zellen CD3 und zumeist einen der T-Zell-Co-Rezeptoren CD4 oder CD8. NK-Zellen exprimieren dagegen weder CD19 noch CD3, dafür jedoch CD16, NK1.1 und DX5. Kann man ein bestimmtes Muster an Oberflächenmarkern und gegebenenfalls auch intrazellulären Proteinen (z.B. Interferon- γ) nachweisen, so ermöglicht dies Rückschlüsse auf den Zelltyp und z.T. sogar deren Aktivierungsgrad.

Zur Markierung der Identifikationsstrukturen werden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Diese können als Direktantikörper die zellulären Marker selbst erkennen und binden. Ist kein Direktantikörper verfügbar, so besteht die Möglichkeit, den zellulären Marker mit einem nicht farbstoffgebundenen Antikörper zu binden und an diesen wiederum einen fluoreszenzmarkierten Zweitantikörper zu koppeln. In dieser Arbeit wurde dazu ein Biotin-Streptavidin-System verwendet. Den ersten Schritt der durchflusszytometrischen Analyse stellt also eine Färbereaktion dar, in dem die zu untersuchenden Zellstrukturen via Antikörperbindungsreaktion mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden.

Die weitere Analyse findet mithilfe des Durchflusszytometers statt. Verdünnt in isotoner Salzlösung (FACS-Puffer) werden die Proben als Zellsuspension in Analyseröhrchen gefüllt. Diese passen auf einen Anschlusssockel des Durchflusszytometers. Durch Luftdruck wird die Suspension in eine zentral eintauchende Metallkapillare gedrückt und erreicht so die im Gerät befindliche Messküvette. Durch die

Geschwindigkeit des Flusses werden Zellaggregate aufgelöst, sodass die Zellen einzeln und der Reihe nach den gebündelten Strahl eines Lasers passieren können. Man spricht bei diesem Prinzip von „hydrodynamischer Fokussierung“ (Abb. 4, A).

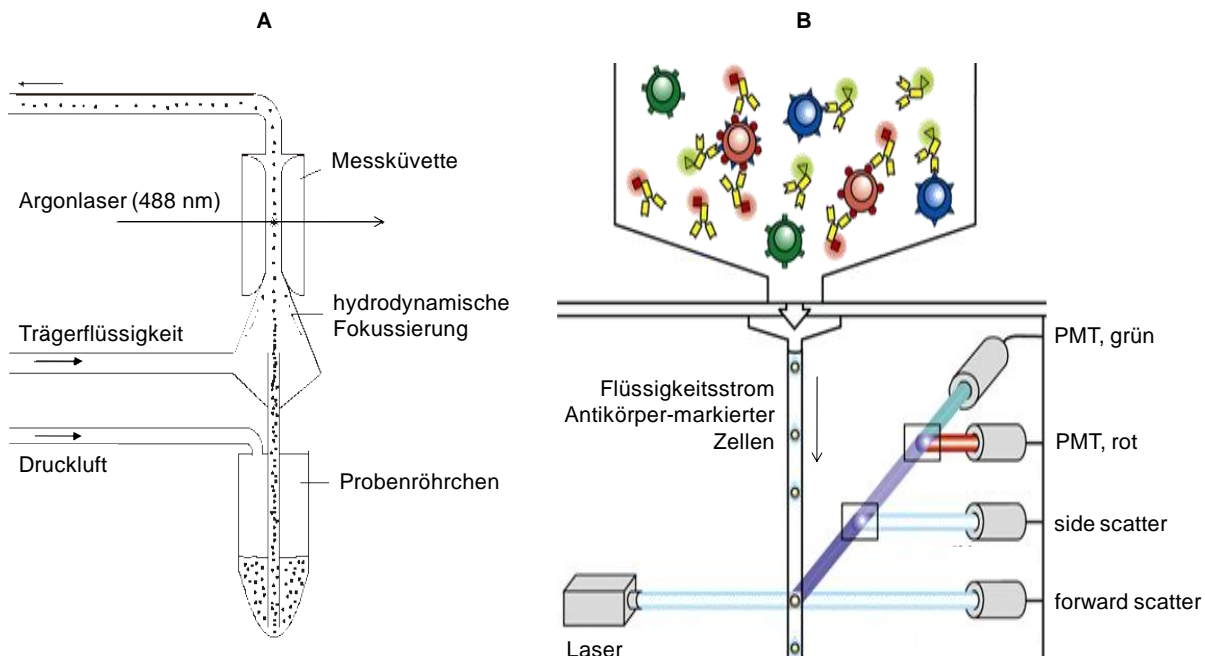


Abb. 4: Grundlagen der (A) „hydrodynamischen Fokussierung“ und (B) fluoreszenzbasierter Zellanalyse im Durchflusszytometer. (A) Die Zellen der Analyseprobe gelangen durch Druckluft in eine Metallkapillare und werden dort linear angeordnet. (B) Die zuvor mit fluoreszierenden Antikörpern markierten Zellen passieren anschließend der Reihe nach einen Argonlaser, dessen Strahl durch deren Größe und Granularität charakteristisch abgelenkt wird. Zusätzlich wird die Emission der Antikörper-gekoppelten Fluorochrome ermittelt, in Photomultiplier Tubes verstärkt und via angeschlossener Software analysiert (modifiziert nach Janeway (Janeway, 2008)).

In der Kuvette passieren die Zellen den auf 488 nm eingestellten monochromatischen Strahl eines Argonlasers. Dieser wird je nach Morphologie der Zelle charakteristisch abgelenkt. Das Vorwärtsstreuung Licht (FSC, forward scatter) gibt dabei Auskunft über die Zellgröße, das Seitwärtsstreuung Licht (SSC, side scatter) über die Zellgranularität. Gleichzeitig werden durch die Energie des Lasers Elektronen der antikörpergebundenen Fluoreszenzfarbstoffe auf ein höheres Niveau gehoben. Beim Austreten aus dem Strahl fallen diese unter Emission von Photonen auf ihr Ausgangsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich dabei proportional zur Menge gebundener Fluoreszenzantikörper. D.h. je häufiger ein zellulärer Marker auf der Zelle exprimiert wird, desto mehr Antikörper werden gebunden und desto stärker ist das emittierte Signal. Spezielle Photometer, sogenannte Photomultiplier tubes (PMTs), detektieren das Ausmaß der Streuung und die Emission der Fluoreszenz-Antikörper. Die Signale werden durch die PMTs verstärkt und in elektronische Signale umgewandelt (Abb. 4, B).

Die an das Gerät angeschlossene Software verarbeitet die Informationen und ermöglicht eine quantitative und qualitative Darstellung der Analyse im Histogramm oder einem zweidimensionalen Streudiagramm.

Der parallele Einsatz von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, da sich diese bei gleicher Wellenlänge anregen lassen, aber über jeweils unterschiedliche Emissionsspektren verfügen. Die Farbstoffe können so unterschieden werden. Dennoch kann es, gerade beim Einsatz von sehr vielen Farbstoffen, zu Überlappungen der Emissionsspektren kommen. Die Folge wäre eine Verfälschung der Ergebnisse. Durch eingebaute optische Filter, die dazu führen, dass nur die Hauptbereiche der Emissionsspektren detektiert werden, kann diese Fehlerquelle aber bereits im Gerät verringert werden. Zusätzlich wird vor jeder Analyse eine Software-unterstützte Kompensation durchgeführt, um überlappende Signale noch besser unterscheiden zu können.

2.2.10 Durchflusszytometrie im *In-vivo*-Abstoßungsassay

Den letzten Schritt des Tumorzell-Assays stellt die Analyse im Durchflusszytometer dar. Die Proben wurden in je 150 µl FACS-Puffer aufgenommen und unmittelbar vor der Messung im Gerät mit 50 µl einer 1:2000 verdünnten DAPI-Färbelösung versetzt.

Die Analyse im Rahmen der Untersuchungen mit Lymphomzellen erfolgte immer direkt im Anschluss an den Färbeschritt mit PE-Cy7, um ein Zerfallen des kombinierten Fluoreszenzfarbstoffes nicht zu riskieren. Eine Ergebnisverfälschung durch ein nach Zerfall entstehendes überhöhtes PE-Signal konnte auf diese Weise vermieden werden.

Als Fluorochrome standen demnach in Untersuchungen mit *B2m*^{-/-}-Zellen standardmäßig CFSE und DAPI, in Untersuchungen mit RMA-S-Zellen zusätzlich PE-Cy7, zur Verfügung. DAPI, erkennbar im Pacific Blue-Kanal, diente dabei zur Negativauswahl toter Zellen und Gewebedetritus. Trotz vorheriger Aufbereitung der Organe fand sich stets noch eine große Zahl solcher, für die Analyse nicht verwertbarer, Zellen. Da tote Zellen zu unspezifischen Bindungen von Fluoreszenzantikörpern neigen können, war es sinnvoll, diese mit einer eigenen Färbung in der Analyse auszuschließen. PE-Cy7 wurde an CD45 gekoppelt. Durch diese Färbung lässt sich eine Positivauswahl aller hämatopoetischen Zellen treffen. Dies ist ebenso entscheidend wie der Ausschluss der toten Zellen, da auch nach Aufbereitung via Lympholyte-Gradient nicht hämatopoetische Lungenzellen die Probe verunreinigen.

CFSE, gemessen im FITC-Kanal, grenzt nach dieser Art der Vorauswahl letztlich eindeutig die Donorzellen ab, da nur diese zuvor intrazellulär markiert wurden. Zu beachten ist, dass die

Markierung gezielt mit zwei verschiedenen Konzentrationen an CFSE stattfand, sodass in der Analyse zwischen *high*- und *low*-markierten Zellpopulationen unterschieden werden konnte.

Das abschließende Gating wurde bei allen Experimenten in gleicher Weise durchgeführt. Zunächst wurde in der FITC versus SSC-Darstellung derjenige Bereich detektiert, in dem der Großteil an CFSE positiven Zellen lag. Dieses Gate konnte auf das FSC / SSC-Diagramm übertragen werden, um hier einen noch genaueren Ausgangsbereich zu bestimmen. Ausgehend von dieser Zellpopulation wurden die im SSC / Pacific Blue-Diagramm enthaltenen toten Zellen ausgeschlossen. Dabei wurde das Gate auf den DAPI-negativen Bereich gelegt. Die ausgewählten Zellen wurden durch Anzeige im Pacific Blue versus PE-Cy7-Diagramm auf ihre CD45-Positivität selektiert. Auf diesen Schritt konnte in der Untersuchung von *B2m*^{-/-}-Donorzellen verzichtet werden. In der Darstellung des FITC / PE-Cy7-Diagramms konnten nun die CFSE positiven Zellpopulationen untereinander und von der CFSE negativen Population abgegrenzt werden.

2.2.11 Histogramm- und Quotientendarstellung CFSE-positiver Zellen

Durch die alleinige Auswahl CFSE positiver Zellen im FACS-Plot konnten die applizierten Donorzellen als Histogramm dargestellt werden. Es ergaben sich zwei, entsprechend der vorherigen *high*- bzw. *low*-Markierung in ihrem CFSE-Signal differierende, Peaks. Die Höhe der Peaks gab dabei Auskunft über die Menge der jeweils verbliebenen Donorzellen im Organ. Diese wurden in Prozent vom Gesamtanteil CFSE-markierter Zellen angegeben.

Zur statistischen Analyse und Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Untersuchungen wurde die Menge der CFSE^{high}-markierten Zellen auf die Menge der verbliebenen CFSE^{low}-markierten Zellen bezogen (% CFSE^{high} / % CFSE^{low}). Da die injizierte Zellsuspension nicht exakt auf ein 1:1-Verhältnis zwischen *high*- und *low*-markierten Zellen eingestellt werden konnte, wurde das Maß der Abstoßung nach Injektion zusätzlich auf ihren initialen Wert in der Zellsuspension, d.h. vor Injektion, bezogen (nach Injektion / vor Injektion). Es ergibt sich folgende Formel zur Berechnung des Abstoßungsquotienten:

$$Q = \frac{(\% \text{ CFSE}^{\text{high}} / \% \text{ CFSE}^{\text{low}}) \text{ nach Injektion}}{(\% \text{ CFSE}^{\text{high}} / \% \text{ CFSE}^{\text{low}}) \text{ vor Injektion}}$$

3 ERGEBNISSE

3.1 *In-vitro*-Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen

3.1.1 Keine *In-vitro*-Lyse von $B2m^{-/-}$ -Zellen ohne vorherige *In-vivo*-Stimulation

Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, dass Natürliche Killerzellen *in vivo* in der Lage sind, Klasse I MHC-defiziente Zellen zu lysieren (Oberg et al., 2004). Im Gegensatz dazu sind NK-Zellen nicht in der Lage Klasse I MHC-defiziente Zellen *in vitro* zu lysieren. Um eine suffiziente Lyse *in vitro* zu erzielen, müssen NK-Zellen zuerst *in vivo* oder *ex vivo* stimuliert werden (Höglund et al., 1991; Liao et al., 1991; Ljunggren et al., 1988). Für die Konstellation einer eingeschränkten Lysefunktion *in vitro* ohne vorherige Stimulation, bei gleichzeitiger kompetenter Lysefunktion *in vivo*, lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass NK-Zellen erst nach Ablauf von *In-vivo*-Bahnungsprozessen ihre vollständige Effektorfunktion erlangen können.

Als Klasse I MHC-defiziente Targetzellen dienten in dieser Arbeit $B2m^{-/-}$ -Milzzellen. Erstes Ziel war es daher, die prinzipielle Notwendigkeit einer vor die Abstoßung der $B2m^{-/-}$ -Zellen geschalteten NK-Stimulation zu bestätigen. Dazu wurde ein $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungssassay durchgeführt, in dem die Zytotoxizität von NK-Zellen mit und ohne vorherigem Stimulus verglichen werden konnte. Die Stimulation wurde dabei 16 Stunden vor Gewinnung der NK-Zellen aus der Milz durch Injektion von 100 μg poly(I:C) induziert. Als Targetzellen dienten Concanavalin A (ConA)-aktivierte T-Zell-Basten aus $\beta_2\text{M}$ -defizienten Donormäusen sowie zur Kontrolle die als klassische NK-Targets bekannten murinen T-Lymphomzellen YAC-1.

In der Auswertung wird ersichtlich, dass ohne eine vorherige *In-vivo*-Stimulation mit poly(I:C) nahezu keine Lyse von $B2m^{-/-}$ -Zellen stattfinden konnte. Mit Stimulation dagegen konnte die Lyserate deutlich angehoben werden. Diese Ergebnisse wurden durch den Vergleich mit YAC-1-Zellen bestätigt, wobei sich dort der Effekt einer poly(I:C)-Stimulation noch deutlicher zeigte. Ebenfalls lässt sich erkennen, dass YAC-1-Zellen stets einer stärkeren Lyse unterlagen als $B2m^{-/-}$ -Zellen (Abb. 5).

Der Zytotoxizitätsassay zeigt deutlich, wie stark im *In-vitro*-Versuch die Lyse-Kompetenz der NK-Zellen von einer vorherigen *In-vivo*-Stimulation mit poly(I:C) abhängig ist. Die Ergebnisse bestätigen so die Annahme, dass zur Abstoßung der in dieser Arbeit verwendeten $B2m^{-/-}$ -Zellen eine vorausgehende Stimulation von NK-Zellen notwendig ist. Darüberhinaus wird ersichtlich, dass YAC-1-Zellen ein potenteres NK-Target darstellen als $B2m^{-/-}$ -Zellen, was auf ihre Expression von NK-Zell-aktivierenden Liganden wie NKG2D-Liganden (z.B. Rae-1, H60) zurückzuführen ist.

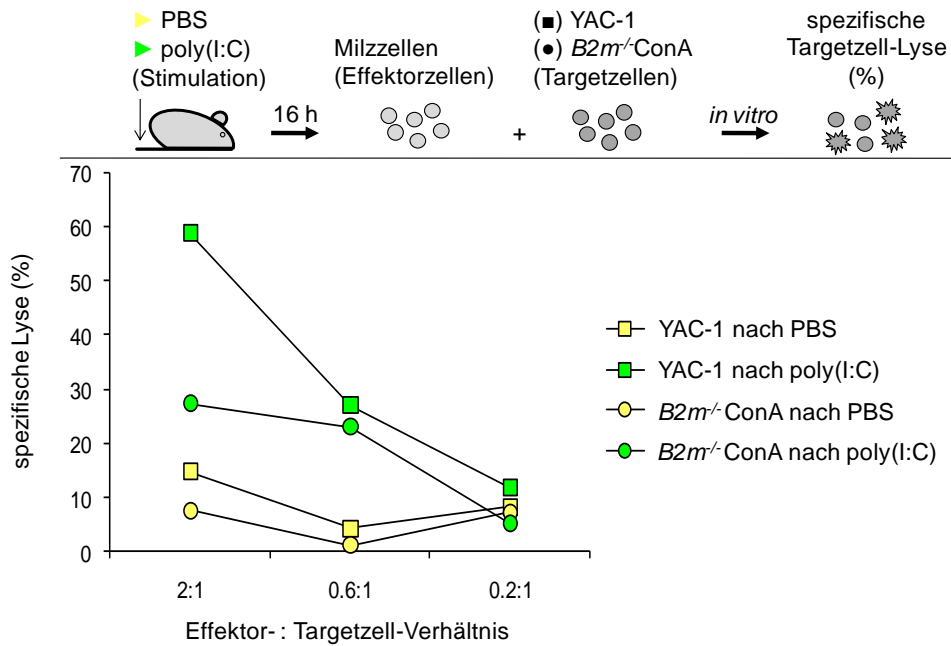


Abb. 5: Spezifische Lyserate mit und ohne vorheriger *In-vivo*-Stimulation Natürlicher Killerzellen durch i.p.-Gabe von 100 µg poly(I:C) (Stimulation) oder PBS (keine Stimulation) 16 Stunden vor Isolierung und *in vitro* Targetzellkontakt mit Concanavalin A stimulierten (●) $B2m^{-/-}$ -Milzzellen und (■) YAC-1-Lymphomzellen. Markierung der Targetzellen und Ermittlung der spezifischen Lyserate durch klassischen $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungssassay in absteigenden Effektor- : Targetzell-Verhältnissen.

3.1.2 Die Immunisierung mit apoptotischen Zellen erzeugt keine Aktivitätssteigerung Natürlicher Killerzellen

Nach Klärung der Frage, wie sich $B2m^{-/-}$ -Zellen als NK-Target darstellen, war es ebenfalls von Bedeutung zu untersuchen, ob sie selbst auch als Stimulus dienen können, d.h. NK-Zellen im Sinne einer Sensibilisierung dazu anregen, klassische Zielzellen stärker abzustößen. Dazu wurde ein weiterer $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungssassay durchgeführt, in dem B6-Mäuse 48 Stunden vor Entnahme ihrer Milz eine $B2m^{-/-}$ -Zellsuspension i.v. injiziert bekamen. Da ein Effekt nicht nur auf der Klasse I MHC-Defizienz, sondern auch auf dem apoptotischen Potential der injizierten Zellen beruhen kann (Sauter et al., 2000), wurden vergleichbare Untersuchungen auch nach Gabe von $B2m^{+/+}$ -Zellen durchgeführt. Als Targetzellen im Assay dienten YAC-1- und RMA-S-H60-Zellen.

NK-Zellen aus zuvor mit poly(I:C) stimulierten Mäusen zeigten gegenüber beiden verwendeten Targetzelllinien eine deutlich gesteigerte Lyserate. Nicht so jedoch NK-Zellen aus Mäusen mit vorheriger Injektion einer $B2m^{-/-}$ - oder $B2m^{+/+}$ -Zellsuspension. Ihre Lyserate blieb gering und vergleichbar mit den Negativkontrollen der mit PBS (Daten nicht gezeigt) behandelten Mäuse (Abb. 6).

Ein vergleichbares Bild zeigte sich in einem ebenso durchgeführten IFN- γ -Freisetzungssassay (Daten nicht gezeigt). Hier überstieg die Produktion von IFN- γ nach vorheriger Stimulation mit poly(I:C)

deutlich die der anderen Gruppen. Es ließ sich kein Unterschied zwischen Kontrollmäusen nach Gabe von PBS und Mäusen nach Gabe von $B2m^{-/-}$ bzw. $B2m^{+/+}$ -Zellen erkennen.

In der Zusammenschau der Ergebnisse wird deutlich, dass eine Injektion sowohl von $B2m^{-/-}$ als auch von $B2m^{+/+}$ -Zellen nicht zu einer Stimulation von NK-Zellen führt. Sowohl die Lyserate von Targetzellen im $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungssassay als auch die Produktion von IFN- γ unterschieden sich nicht von denen unstimulierter Kontrollgruppen.

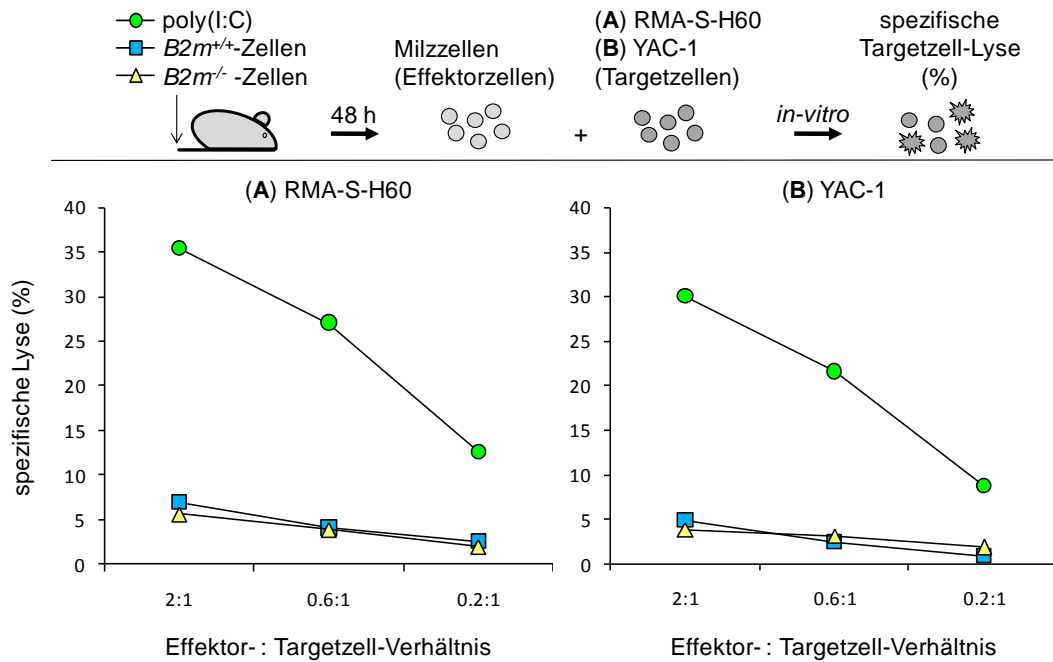


Abb. 6: spezifische Lyserate Natürlicher Killerzellen nach *In-vivo*-Immunisierung mit (▲) $B2m^{-/-}$ oder (■) $B2m^{+/+}$ -Zellen 48 Stunden vor Isolation und Targetzellkontakt, verglichen mit (●) der spezifischen Lyserate nach *In-vivo*-Stimulation durch 100 μg poly(I:C) i.p.; jeweils gegenüber (A) RMA-S-H60 und (B) YAC-1 als Targetzellen. Markierung der Targetzellen und Ermittlung der spezifischen Lyserate durch klassischen $^{51}\text{Chrom}$ -Freisetzungssassay in absteigenden Effektor- : Targetzell-Verhältnissen.

3.2 Grundlagen des *In-vivo*- $B2m^{-/-}$ -Abstoßungsassays

Kernpunkt dieser Arbeit ist die Untersuchung derjenigen *In-vivo*-Mechanismen, auf die Natürliche Killerzellen angewiesen sind, um ihre vollständige Effektorfunktion gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen zu erlangen. Dazu konnte ein *In-vivo*-Modell zur Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen aufgegriffen (Fernandez et al., 2005; Oberg et al., 2004) und für diese spezielle Fragestellung etabliert werden (Abb. 7).

Dabei wurden Klasse I MHC-defiziente Milzzellen aus $B2m^{-/-}$ -Donor-Mäusen intrazellulär mit CFSE markiert (CFSE^{high}) und B6-Akzeptor-Mäusen intravenös injiziert. Gleichzeitig wurde in jede Akzeptor-Maus eine Kontrollpopulation, bestehend aus $B2m^{+/+}$ -, d.h. Klasse I MHC-exprimierenden Donor-Milzzellen, injiziert. Diese wurden ebenfalls mit CFSE markiert, jedoch wurde im Vergleich zu den

$B2m^{-/-}$ -Zellen eine um den Faktor 10 niedrigere CFSE-Konzentration gewählt, $CFSE^{low}$. Nach drei Tagen konnte die für jede Akzeptor-Maus individuelle Last an injizierten Donorzellen in der Milz mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

$B2m^{-/-}$ - und $B2m^{+/+}$ -Zellen wurden dabei in je gleichen Anteilen als gemeinsame Zellsuspension injiziert. Diese wurde vor Injektion stets auf ihr Mischungsverhältnis kontrolliert und konnte bei größeren Abweichungen vom Idealfall eines 1:1-Verhältnisses entsprechend korrigiert werden. So fand sich in der folgenden durchflusszytometrischen Analyse in Form der nicht abgestoßenen $B2m^{+/+}$ -Zellen immer auch eine konstante Bezugspopulation zur je nach experimenteller Situation unterschiedlich stark abgestoßenen Population an $B2m^{-/-}$ -Zellen. Das Ausmaß der $B2m^{-/-}$ -Zellabstoßung korrelierte dabei mit der Reduktion $CFSE^{high}$ -markierten Zellen in der Durchflusszytometrie. Aufgrund des verschiedenen starken CFSE-Signals ließen sich die Peaks von $B2m^{+/+}$ - ($CFSE^{low}$) und $B2m^{-/-}$ -Zellen ($CFSE^{high}$) gut gegeneinander abgrenzen.

Das Maß der Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen wurde jeweils in Bezug zur Menge an $B2m^{+/+}$ -Zellen gesetzt und ließ eine Aussage zu, inwieweit Klasse I MHC-defiziente Zellen stärker abgestoßen wurden als Klasse I MHC-exprimierende Zellen.

Dieses System der vergleichenden Zellabstoßung wurde im Folgenden auf zwei verschiedene Mauspopulationen erweitert. Als Kontrollmäuse dienten, wie oben dargestellt, gesunde immunkompetente B6-Wildtypmäuse. Immer beziehend auf diese Kontrollpopulation mit konstanter Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen, konnten Mäuse auf C57BL/6-Hintergrund, jedoch mit isolierter Defizienz eines immunmodulatorischen Faktors (z.B. $Ifnar^{-/-}$ -Mäuse), untersucht werden. Zeigte sich hier eine verminderte Abstoßungsfähigkeit der $B2m^{-/-}$ -Zellen, so ließ dies darauf schließen, dass es sich bei dem Defekt um einen für die NK-abhängige Zellabstoßung essentiellen Faktor handelt.

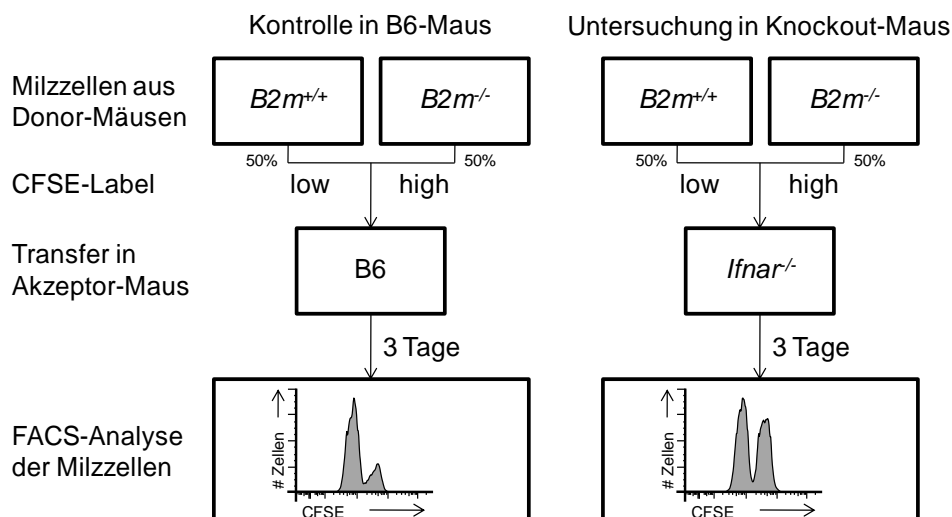


Abb. 7: Schema des *In-vivo*- $B2m^{-/-}$ -Abstoßungsassays

Zur durchflusszytometrischen Analyse wurde in jedem der Versuche die gleiche Gating-Abfolge angewandt (Abb. 8). Dabei erfolgte nacheinander eine Selektion auf die Lymphozytenpopulation der aufgenommenen Milzzellen, die darin enthaltenen lebenden Zellen (DAPI negativ) und letztlich auf die CFSE-positiven, d.h. die zuvor markierten und injizierten Zellen der Donor-Mäuse. Diese konnten zur anschaulicheren Vergleichbarkeit als Histogramm dargestellt werden. Hier zeigten sich zwei Peaks, entsprechend den CFSE^{low}-markierten *B2m*^{+/-}- und den CFSE^{high}-markierten *B2m*^{-/-}-Zellen. Angegeben sind jeweils die prozentualen Anteile der *high*- bzw. *low*-markierten Zellen am Gesamtanteil CFSE-positiver Zellen.

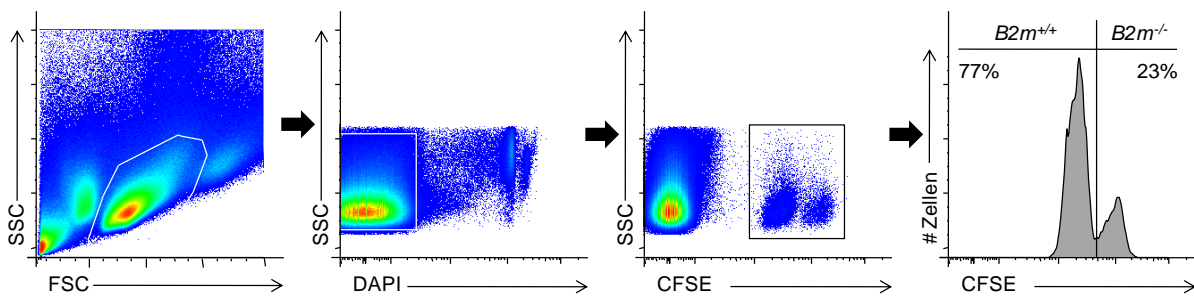


Abb. 8: Standardgating der durchflusszytometrischen Analyse im Rahmen des *In-vivo-B2m*^{-/-}-Abstoßungsassays

3.2.1 *B2m*^{-/-}-Zellen werden innerhalb von sechs Tagen fast vollständig abgestoßen

Vor Beginn der Untersuchungen an immunkompromitierten Mäusen galt es, den zeitlichen Verlauf einer regelrechten *B2m*^{-/-}-Zellabstoßung in B6-Mäusen zu klären. Die *In-vivo-B2m*^{-/-}-Abstoßungsassays wurden daher für verschiedene Zeitpunkte durchgeführt. Entsprechend der Fähigkeit des angeborenen Immunsystems schnell Targetzellen zu erkennen und zu lysieren, wurde die Abstoßung an Tag zwei, vier und sechs nach Targetzellanjektion untersucht.

Die vorausgehenden Kontrollen der injizierten Zellsuspensionen zeigten für die Kontrollkombination mit CFSE^{low}- und CFSE^{high}-markierten *B2m*^{+/-}-Zellen ein sehr gutes Verhältnis von nahezu jeweils 50%. Im Ansatz der Mischung aus *B2m*^{+/-}- und *B2m*^{-/-}-Zellen war das Verhältnis auf Seiten der CFSE^{high}-markierten Zellen verschoben, musste in diesem Fall jedoch nicht korrigiert werden (Abb. 9). Vergleichbare Kontrollen wurden im Rahmen jedes Assays dieser Arbeit durchgeführt, sind aber nur an dieser Stelle exemplarisch dargestellt.

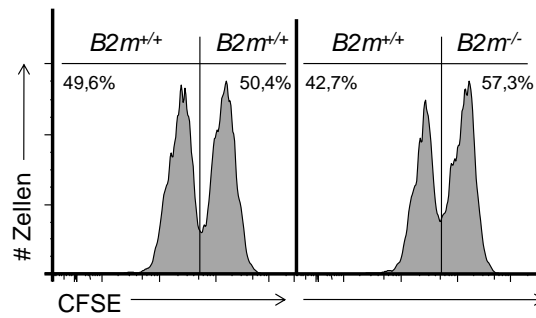


Abb. 9: Verhältniskontrolle der Zellsuspensionen vor Injektion

Die Auswertung der Zeitkinetik (Abb. 10) zeigt, dass nach zwei Tagen die $B2m^{-/-}$ -Zellen noch 23% der Gesamt-CFSE-Population ausmachten. Ausgehend von ihrem Ursprungswert in der injizierten Zellsuspension mit 57% bedeutet dies eine Abstoßung von etwa 60%. Nach vier Tagen betrug ihr Anteil noch 6,4%, entsprechend einer Abstoßung von zu diesem Zeitpunkt knappen 90%. Sechs Tage nach Injektion der Donorzellsuspension waren die $B2m^{-/-}$ -Zellen nahezu vollständig abgestoßen, ihr Anteil lag bei unter 2%.

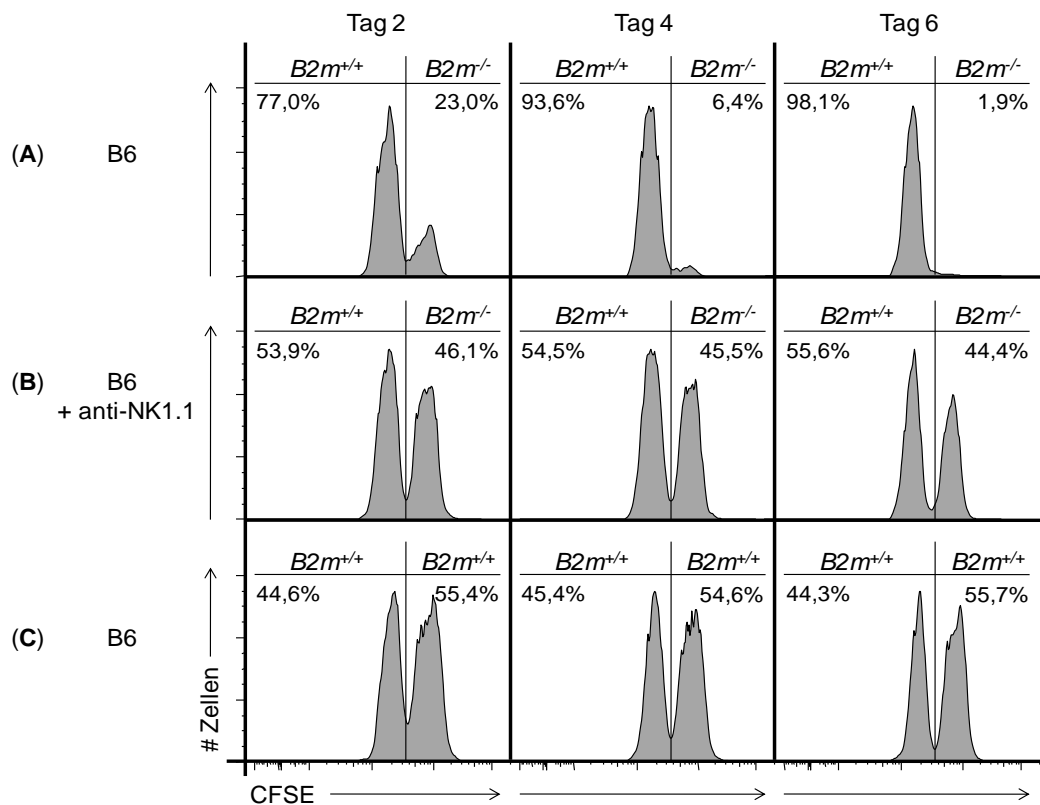


Abb. 10: Zeitkinetik der $B2m^{-/-}$ -Zellabstoßung in (A) B6-Wildtypmäusen und (B) nach NK-Depletion durch Gabe von 200 μg NK1.1-Antikörper (PK136) am Tag -1, verglichen mit (C) der $B2m^{+/+}$ -Zellkonstante in B6-Wildtypmäusen an den Tagen 2, 4 und 6 nach Donorzellinjektion. Darstellung der prozentualen Anteile von CFSE^{low}- ($B2m^{+/+}$) und CFSE^{high}- ($B2m^{-/-}$ oder $B2m^{+/+}$) markierten Zellen an der Gesamtheit CFSE-markierter Zellen.

Im Vergleich dazu ließ sich in zuvor mit NK1.1-Antikörpern behandelten, d.h. NK-Zell-depletierten Mäusen, kaum eine Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen beobachten. Ihr Anteil sank auf etwa 45%, blieb dann aber über den beobachteten Zeitraum der sechs Tage konstant.

Nach Injektion der Kontrollkombination mit *B2m*^{+/-}-Milzzellen als sowohl CFSE^{low}- als auch CFSE^{high}-markierter Population blieb der Anteil CFSE-hoch-markierter Milzzellen stets auf gleichem Niveau und hielt sich mit den niedrig markierten Zellen die Waage. Es zeigte sich daher ein über die gesamte Zeit konstantes Verhältnis von jeweils etwa 50%. Diese für die Validität jedes einzelnen Versuchs wichtige Kontrolle wurde ebenfalls in allen weiteren Versuchen dieser Arbeit mitgeführt, ist aber aus Gründen der Übersichtlichkeit im Folgenden nicht mehr dargestellt.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wurde der Zeitpunkt für alle weiteren Versuche auf 72 Stunden nach Donorzellinjektion festgelegt. Nach dieser Zeit lässt sich ein deutliches Bild der Abstoßung erwarten, ohne dabei alle *B2m*^{-/-}-Zellen zu verlieren. Diese Situation eignet sich am besten zur Beurteilung eventueller Unterschiede der Abstoßungskompetenz von B6-Wildtypmäusen gegenüber immunkompromitierten Mäusen.

3.2.2 Die *In-vivo*-Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen ist direkt abhängig von NK-Zellen

Die NK-Zell-Abhängigkeit der *In-vitro*-Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen ist bereits hinreichend belegt (Höglund et al., 1991; Liao et al., 1991). Um diese Gültigkeit auch für den in dieser Arbeit angewendeten *In-vivo*-Assay zu erbringen, bzw. andere Effektorzellen als Ursache der Abstoßung auszuschließen, wurde ein *In-vivo*-*B2m*^{-/-}-Abstoßungsassay mit Antikörper-depletierten und zytolytisch insuffizienten NK-Zellen durchgeführt. Dabei wurde zur Depletion von NK-Zellen eine Gruppe an Mäusen mit einem NK1.1-Antikörper (PK136) vorbehandelt (Seaman et al., 1987). Die Wirkung einer ausgeschalteten Lysefunktion der NK-Zellen konnte in einer zweiten Gruppe durch Verwendung von Perforin-defizienten Mäusen (*Prf1*^{-/-}) dargestellt werden.

Sowohl in Mäusen nach Gabe von Anti-NK1.1-Antikörpern als auch in *Prf1*^{-/-}-Mäusen konnten injizierte *B2m*^{-/-}-Milzzellen nicht suffizient abgestoßen werden. Nach drei Tagen zeigte sich in diesen Mäusen, verglichen mit dem Zeitpunkt Null der Injektion (Daten nicht gezeigt), eine nahezu unveränderte Peakkonstellation mit gleichen Anteilen an *B2m*^{+/-}- wie *B2m*^{-/-}-Milzzellen. Im Gegensatz dazu stand eine erwartete und im Schnitt mit etwa 50% regelhafte Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Milzzellen in unbehandelten B6-Wildtypmäusen (Abb. 11).

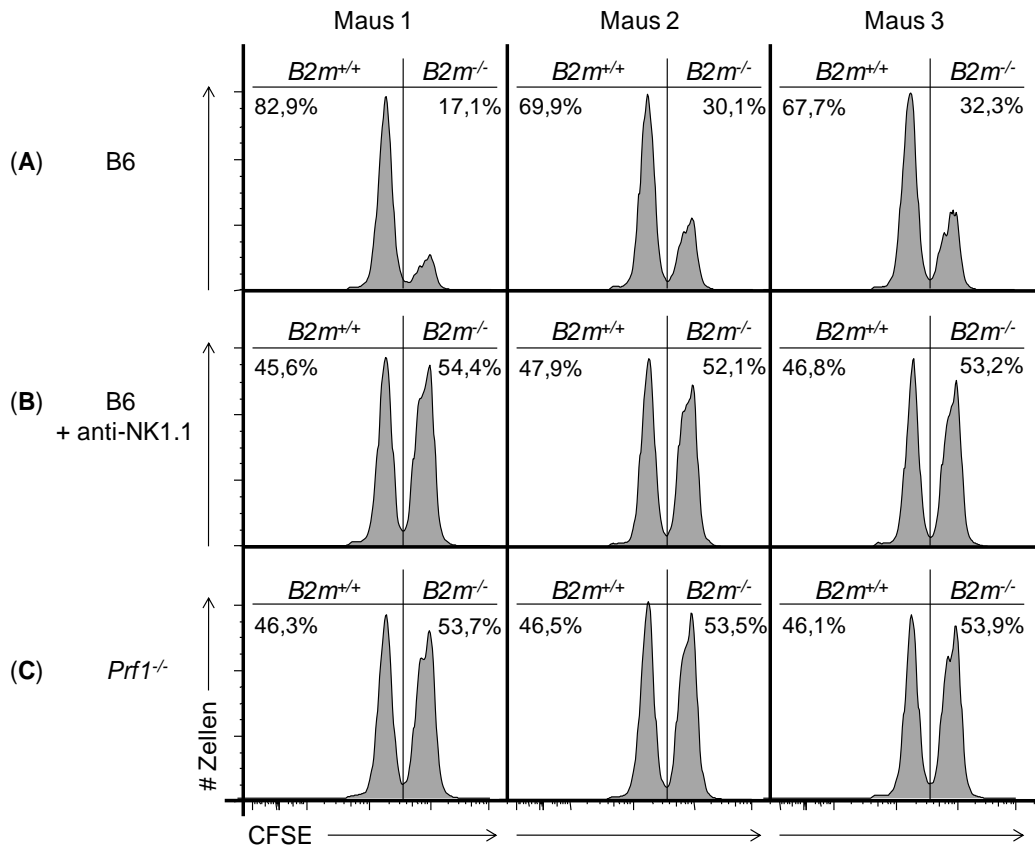


Abb. 11: Histogrammdarstellung der NK-abhängigen *In-vivo*-Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen in (A) B6-Wildtypmäusen, (B) nach NK-Depletion durch Gabe von 200 µg NK1.1-Antikörper (PK136) am Tag -1 und (C) *Prf1*^{-/-}-Mäusen, jeweils dargestellt durch drei repräsentative Mäuse am Tag 3 nach Donorzellinjektion. Darstellung der prozentualen Anteile CFSE^{low}- (*B2m*^{+/+}) und CFSE^{high}- (*B2m*^{-/-}) markierter Zellen am Gesamtanteil CFSE-markierter Zellen.

Um bessere quantitative Aussagen treffen zu können, werden die folgenden Ergebnisse dieser Arbeit nicht als Histogramm der durchflusszytometrischen Analyse, sondern als Quotient der beobachteten Zellabstoßung dargestellt (Abb. 12). Dieser ergibt sich dabei aus dem Verhältnis von CFSE^{high}-markierten *B2m*^{-/-}-Zellen zu CFSE^{low}-markierten *B2m*^{+/+}-Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung. Die Werte sind jeweils korrigiert um das Verhältnis von *B2m*^{-/-}- zu *B2m*^{+/+}-Zellen vor Injektion. Es ergibt sich folgende Berechnungsformel:

$$Q = (\%CFSE^{high} / \%CFSE^{low} \text{ nach Injektion}) / (\%CFSE^{high} / \%CFSE^{low} \text{ vor Injektion})$$

Für den bereits in der Histogrammdarstellung gezeigten Nachweis der NK-Abhängigkeit ergibt sich somit die folgende, für alle weiteren Ergebnisse ebenfalls verwendete Quotientendarstellung:

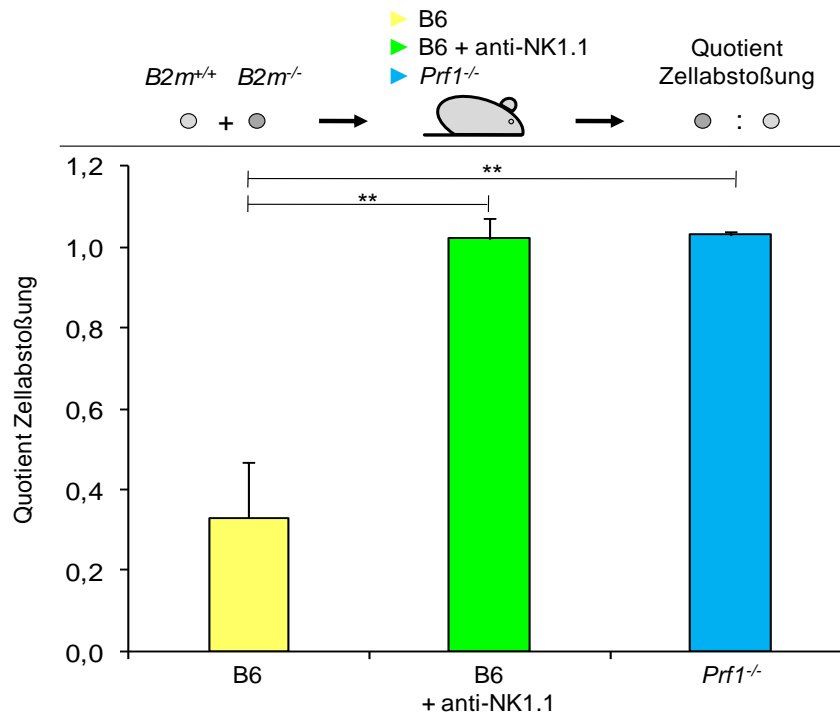


Abb. 12: Quotientendarstellung der NK-abhängigen *In-vivo*-Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen in B6-Wildtypmäusen, nach NK-Depletion und in *Prf1*^{-/-}-Mäusen. Ein Balken repräsentiert dabei jeweils den Mittelwert der Versuchsgruppe aus mindestens drei Mäusen. Untersuchung am Tag 3 nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie die in Stern-Darstellung angezeigten Signifikanzniveaus, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (**p < 0,01).

3.3 Die Depletion von CD11c⁺-Zellen führt zu einem Verlust der Abstoßungskompetenz gegenüber *B2m*^{-/-}-Zellen

Aufbauend auf dem etablierten *In-vivo*-Modell der regulären *B2m*^{-/-}-Zellabstoßung in B6-Wildtypmäusen konnte das Modell zur Untersuchung der beteiligten Faktoren auf Mäuse mit selektiver Immundefizienz erweitert werden.

Sowohl Arbeiten *in vitro* (Andoniou et al., 2005; Ferlazzo et al., 2003; Gerosa et al., 2005; Piccioli et al., 2002) als auch *in vivo* (Lucas et al., 2007; Mortier et al., 2009; Schleicher et al., 2007) beschreiben die essentielle Bedeutung Dendritischer Zellen (DCs) für die Aktivierung Natürlicher Killerzellen. Ein Großteil der Arbeiten bezieht sich dabei auf die Aktivierung im Rahmen der Abwehr mikrobiologischer Pathogene. Untersuchungen zur Rolle Dendritischer Zellen in der Tumorzellabstoßung gibt es dagegen bislang nur wenige. Mit dem Nachweis der DC-Abhängigkeit Natürlicher Killerzellen *in vitro* wurden dazu aber grundlegende Hinweise von Fernandez et al. geliefert (Fernandez et al., 1999), sodass eine entsprechende Untersuchung im *In-vivo*-Modell nahe lag.

Zur Erzeugung einer selektiven Defizienz für Dendritische Zellen konnte sich hier ein Modell von Jung et al. zu Nutze gemacht werden (Jung et al., 2002). Dabei wurden transgene Mäuse mit eingebrachtem und unter Kontrolle des CD11c-Promotors stehendem Diphtherie-Toxin-Rezeptor verwendet. Durch i.p.-Gabe von Diphtherie-Toxin konnte so eine transiente Depletion von CD11c⁺-Zellen induziert werden (Abb. 13).

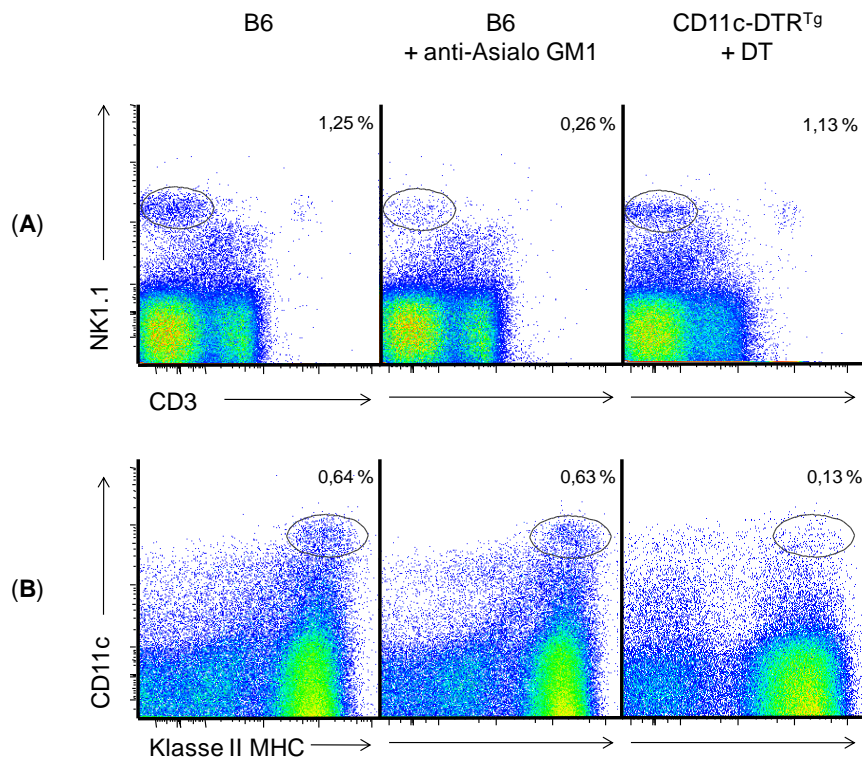


Abb. 13: Depletion Natürlicher Killerzellen und Dendritischer Zellen. Angabe der prozentualen Anteile (A) NK1.1⁺-Natürlicher Killerzellen und (B) CD11c⁺-Dendritischer Zellen an der lienalen Lymphozytenpopulation in unbehandelten B6-Wildtypmäusen, B6-Mäusen nach Gabe von 25 μ l Asialo-GM1-Antiserum und CD11c-DTR^{tg}-Mäusen nach Gabe von 100 ng Diphtherie-Toxin. Induktion der Depletion durch Gabe von Antiserum bzw. Diphtherie-Toxin, jeweils 24 Stunden vor Donorzellinjektion. Kontrolle der Depletion am Tag 3 nach Donorzellinjektion.

Abweichend von dem in dieser Arbeit verwendeten klassischen Abstoßungsassay mit Injektion von zwei unterschiedlich stark CFSE-markierten Donorzellfraktionen wurde hier die Unterscheidung zwischen *B2m*^{-/-}- und *B2m*^{+/-}-Milzzellen dadurch erreicht, dass nur erstere mit CFSE markiert wurden, letztere dagegen aus B6-Donor-Mäusen auf CD45.1-Hintergrund entnommen wurden. Da hier, ebenso wie in allen anderen Untersuchungen, B6-Akzeptor-Mäuse auf CD45.2-Hintergrund verwendet wurden, konnten die transferierten CD45.1-Donorzellen anschließend via Antikörperfärbung eindeutig identifiziert und differenziert werden. Die NK-Depletion in der Kontrollgruppe fand in dieser Untersuchung mithilfe eines Antiserums gegen Asialo GM1 statt, das alle NK-Zellen depletiert (Kasai et al., 1980) (Abb. 13).

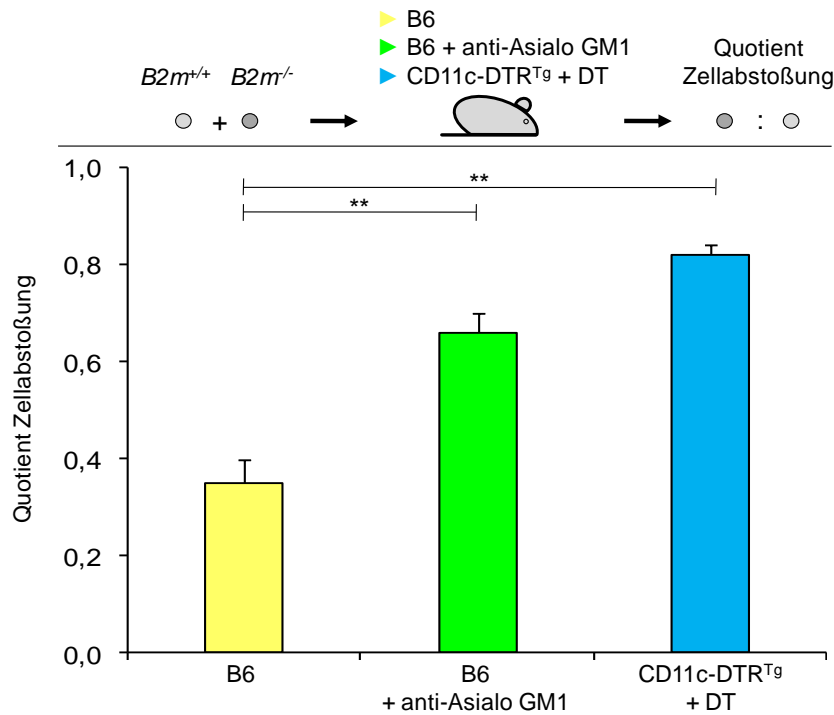


Abb. 14: Fehlende $B2m^{-/-}$ -Zellabstoßung in $CD11c-DTR^{tg}$ -Mäusen nach Depletion Dendritischer Zellen. Darstellung repräsentativer Mittelwerte von jeweils drei Mäusen pro Gruppe aus einem von drei vergleichbaren Experimenten. Depletion Natürlicher Killerzellen bzw. Dendritischer Zellen durch Gabe von anti-Asialo GM1 bzw. Diphtherie-Toxin, 24 Stunden vor Donorzellinjektion. Untersuchung am Tag 3 nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie die in Stern-Darstellung angezeigten Signifikanzniveaus, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (** $p < 0,01$).

Nach drei Tagen fand sich anhand des berechneten Quotienten aus $B2m^{-/-}$ zu $B2m^{+/+}$ -Milzzellen eine deutlich größere Abstoßung in immunkompetenten B6-Wildtypmäusen als in $CD11c-DTR^{tg}$ -Mäusen nach DT-Injektion und B6-Mäusen nach Anti-Asialo-GM1-Injektion (Abb. 14). Dies entspricht einer um etwa 50% verringerten Anzahl an $B2m^{-/-}$ -Zellen in den B6-Wildtypmäusen, gegenüber einer nur geringfügigen Abstoßung der applizierten Zellen in DC- bzw. NK-depletierten Mäusen. Allein durch das Ausschalten Dendritischer Zellen konnte also die NK-Zell-abhängige Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Milzzellen in NK-Zell-kompetenten Mäusen derart unterbunden werden, dass sie mit einer direkten NK-Zell-Depletion vergleichbar wurde. Diese Daten zeigen, dass $B2m^{-/-}$ -Milzzellen in der Abwesenheit von Dendritischen Zellen nicht von NK-Zellen eliminiert werden können.

3.4 Das Typ-I-Interferonsystem in der Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen

3.4.1 Keine Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen in $Ifnar^{-/-}$ -Mäusen

Der Befund, dass Dendritische Zellen auch in der Bahnung von NK-Zell-Effektorfunktionen gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen eine kritische Rolle spielen, erforderte eine tiefergreifendere Untersuchung, welche Mechanismen diesem Zusammenhang zugrunde liegen. Typ-I-Interferone wurden bereits kurz nach der Identifikation und Beschreibung von Natürlichen Killerzellen mit deren

Regulierung und Aktivierung in Verbindung gebracht (Herberman et al., 1978; Trinchieri and Santoli, 1978). Neben der Potenz, insbesondere im Synergismus mit anderen Zytokinen, NK-Zellen direkt zu stimulieren (Hunter et al., 1997), zeigten jüngere Untersuchungen zunehmend auch ihre indirekte Rolle in der Regulierung der NK-Zell-Aktivität durch das Zusammenspiel mit Dendritischen Zellen auf (Gerosa et al., 2005; Granucci et al., 2004). Entsprechend der nachgewiesenen Bedeutung Dendritischer Zellen konnte auch für die hier untersuchten Vorgänge eine Beteiligung von Typ-I-Interferonen vermutet werden, sodass zunächst eine Untersuchung des Typ-I-Interferon-Rezeptors (IFNAR) angeschlossen wurde. Dazu konnte das *B2m*^{-/-}-Abstoßungsmodell auf IFNAR-Knockout-Mäuse (*Ifnar*^{-/-}) übertragen und so der Einfluss des Typ-I-Interferon-Signalwegs getestet werden (Abb. 15).

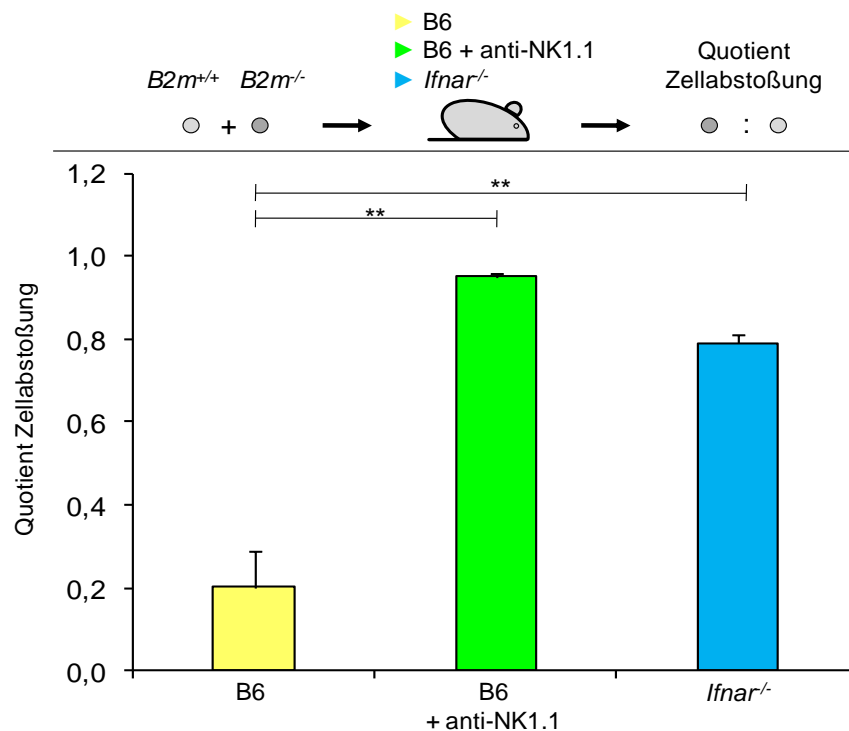


Abb. 15: Die *B2m*^{-/-}-Zellabstoßung ist in *Ifnar*^{-/-}-Mäusen aufgehoben. Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen in *Ifnar*^{-/-}-Mäusen und Kontrollgruppen mit B6-Wildtypmäusen und B6-Mäusen nach NK-Depletion durch i.p.-Gabe von 200 µg NK1.1-Antikörper (PK136), 24 Stunden vor Donorzellinjektion. Untersuchung der Abstoßung am Tag 3 nach Donorzellinjektion. Darstellung repräsentativer Mittelwerte von jeweils drei Mäusen pro Gruppe aus einem von vier vergleichbaren Experimenten. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie die in Stern-Darstellung angezeigten Signifikanzniveaus, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (***p* < 0,01).

Drei Tage nach Injektion von *B2m*^{-/-}-Milzzellen zeigte sich eine signifikant reduzierte Abstoßung der Klasse I MHC-defizienten Zellen in *Ifnar*^{-/-}-Mäusen, verglichen mit der regelrechten Abstoßung in B6-Wildtypmäusen. So fanden sich in den Kontrollmäusen noch etwa 30% der zu Beginn injizierten Targetzellen, in *Ifnar*^{-/-}-Mäusen aber, vergleichbar der Situation in Mäusen nach NK-Zell-Depletion, noch etwa 85%. Die Ergebnisse zeigen, dass das Typ-I-Interferonsystem eine entscheidende Schlüsselrolle in der NK-Zell-abhängigen Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten Zellen einnimmt.

3.4.2 α Interferone, nicht aber Interferon- β , stellen einen kritischen Faktor in der Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen dar

Da sowohl IFN- α als auch IFN- β (wie auch alle weiteren Typ-I-Interferone) an IFNAR binden, lässt dieser Knockout allein keine Differenzierung innerhalb der verschiedenen Typ-I-Interferone zu. Mithilfe von Interferon- β -defizienten Mäusen (*Ifnb1^{-/-}*) sollte daher eine genauere Unterscheidung ermöglicht werden. Ebenfalls getestet wurde die Abstoßung in *Ticam1^{-/-}*-Mäusen, d.h. Mäusen mit selektiver Defizienz für TRIF, einem zentralen Adapterprotein in der TLR3-Signalkaskade und damit klassischem Weg zur Induktion der IFN- β -Expression (Decker et al., 2005).

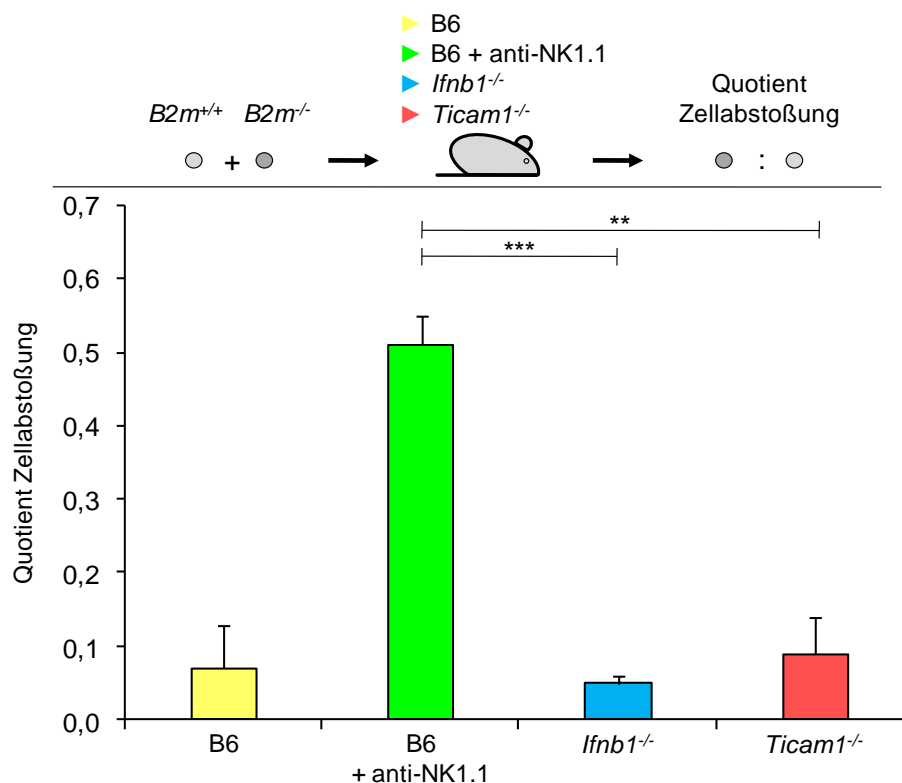


Abb. 16: $B2m^{-/-}$ -Zellabstoßung in IFN- β - und TRIF-defizienten Mäusen. Kontrollgruppen mit B6-Wildtypmäusen und B6-Mäusen nach NK-Depletion durch i.p.-Gabe von 200 μ g NK1.1-Antikörper (PK136), 24 Stunden vor Donorzellinjektion. Untersuchung der Abstoßung am Tag 3 nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie das in Stern-Darstellung angezeigte Signifikanzniveau, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Sowohl IFN- β - als auch TRIF-defiziente Mäuse zeigten die gleiche Kompetenz zur Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen wie immunkompetente B6-Wildtypmäuse (Abb. 16). Die Signalkaskade vom Toll-like-Rezeptor 3 über TRIF zur Induktion von Interferon- β scheint aufgrund dieser Ergebnisse keinen kritischen Faktor für die Aktivierung Natürlicher Killerzellen darzustellen. Da die Ergebnisse in *Ifnar^{-/-}*-Mäusen klar eine Abhängigkeit vom Typ-I-Interferonsystem zeigten, neben IFN- β aber nur IFN- α als maßgeblicher Faktor in diesem System angesehen werden kann, lässt sich anhand der Unabhängigkeit von IFN- β auf eine kritische Rolle der IFN- α schließen.

3.5 Regelrechte *In-vivo*-Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen in IL-12-defizienten Mäusen

Interleukin 12 (IL-12) gilt als potentes Zytokin zur Stimulation Natürlicher Killerzellen. Zahlreiche Studien *in vitro* (Amakata et al., 2001; Gerosa et al., 2002, 2005; Jinushi et al., 2003a) und *in vivo* (Fernandez et al., 1999; Krug et al., 2004; Orange and Biron, 1996) belegen sowohl im Rahmen der Infektionsabwehr als auch der Tumorzellabstoßung die aktivierende Wirkung von IL-12 auf NK-Zellen. Nicht einheitlich dagegen zeigen sich die Ergebnisse bezüglich der Frage, ob IL-12 einen essentiellen (Grufman and Kärre, 2000; Guia et al., 2008; Schleicher et al., 2007) oder einen verzichtbaren, wenngleich verstärkenden (Akazawa et al., 2007; Dalod et al., 2002; Lucas et al., 2007; Smyth et al., 2000), Faktor darstellt. Die IL-12-Abhängigkeit muss daher für jede Konstellation eines DC-NK-Zell-Crosstalks individuell betrachtet werden. Um zu klären, welche Rolle Interleukin 12 in der Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen *in vivo* spielt, wurde die Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen auch in $IL-12p35^{-/-}p40^{-/-}$ -Mäusen untersucht.

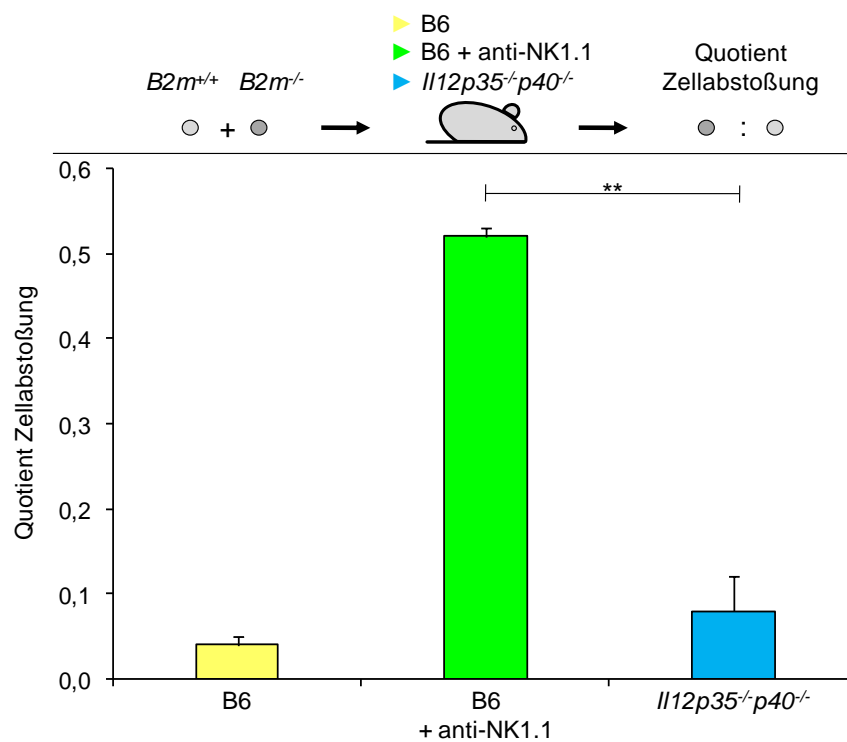


Abb. 17: Ein IL-12-Knockout hat keinen Einfluss auf die regelrechte $B2m^{-/-}$ -Zellabstoßung. $B2m^{-/-}$ -Zellabstoßung in $IL12p35^{-/-}p40^{-/-}$ -Mäusen und Kontrollgruppen mit B6-Wildtypmäusen und B6-Mäusen nach NK-Depletion durch i.p.-Gabe von 200 μ g NK1.1-Antikörper (PK136), 24 Stunden vor Donorzellinjektion. Untersuchung der Abstoßung am Tag 3 nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie das in Stern-Darstellung angezeigte Signifikanzniveau, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (***) ($p < 0,001$).

Die Analyse der Ergebnisse zeigt deutlich, dass *IL-12p35^{-/-}p40^{-/-}*-Mäuse gegenüber B6-Wildtypmäusen keinerlei Einschränkungen aufwiesen, *B2m^{-/-}*-Zellen suffizient abzustößen (Abb. 17). Nach drei Tagen ließen sich in B6-Wildtypmäusen noch etwa 10%, in *IL-12p35^{-/-}p40^{-/-}*-Mäusen noch 15% der ursprünglich injizierten Zellen nachweisen. Daraus lässt sich schließen, dass Interleukin 12 bei der *In-vivo*-Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten Zellen nicht als kritischer Faktor angesehen werden kann.

3.6 Übertragung des *In-vivo*-*B2m^{-/-}*-Abstoßungsassays auf RMA-S-Zellen

Grundlegende Erkenntnisse zur „*missing self*“-Theorie wurden nicht an *B2m^{-/-}*-Zellen, sondern mithilfe von RMA-S-Lymphomzellen gewonnen (Kärre et al., 1986). Dabei handelt es sich um auf Klasse I MHC-Defizienz selektionierte RMA-T-Lymphomzellen. Entsprechend eignen sie sich ebenfalls als ideale Targetzellen zur Untersuchung der NK-Zell-abhängigen Abstoßung MHC-I-defizienter Zellen. Ergänzend zu den Experimenten mit *B2m^{-/-}*-Zellen sollten daher auch die Voraussetzungen zur Abstoßung von RMA-S-Zellen untersucht werden.

3.6.1 Unstimulierte NK-Zellen zeigen *in vitro* eine nur geringe Aktivität gegenüber RMA-S-Zellen

Den Ausgangspunkt stellt dabei ebenfalls die Beobachtung dar, dass auch RMA-S-Zellen *in vitro* keine suffiziente NK-Zell-Effektorkompetenz auslösen können, sofern Natürliche Killerzellen nicht zuvor *in vivo* einem stimulierenden Reiz ausgesetzt waren (Ljunggren et al., 1988). Zur Darstellung dieser Analogie wurden ein weiterer ⁵¹Chrom-Freisetzungsassay (Abb. 18) sowie ein Interferon- γ -Freisetzungsassay (Abb. 19) durchgeführt, wobei jeweils die Aktivität Natürlicher Killerzellen mit und ohne vorherigem *In-vivo*-Stimulus durch poly(I:C) gegenüber RMA- und RMA-S-Zellen als Targetzellen verglichen werden konnte.

Gegenüber beiden Targetzellen zeigten unstimulierte Natürliche Killerzellen eine nur geringe Aktivität. NK-Zellen, die aus zuvor mit poly(I:C) stimulierten B6-Mäusen isoliert wurden, zeigten dagegen eine sowohl deutlich gesteigerte Zytotoxizität als auch Interferon- γ -Freisetzung. Im Vergleich der beiden Lymphomzelllinien offenbart sich die Bedeutung des „*missing self*“. Aufgrund des zusätzlichen Signals durch den Wegfall der Klasse I MHC-vermittelten NK-Zell-Inhibierung stellten RMA-S-Zellen stets den deutlich stärkeren Aktivierungsreiz für Natürliche Killerzellen dar. Sowohl die spezifische Lyserate als auch die Interferon- γ -Freisetzung waren daher im Vergleich zu RMA-Zellen um das zwei- bis dreifache gesteigert.

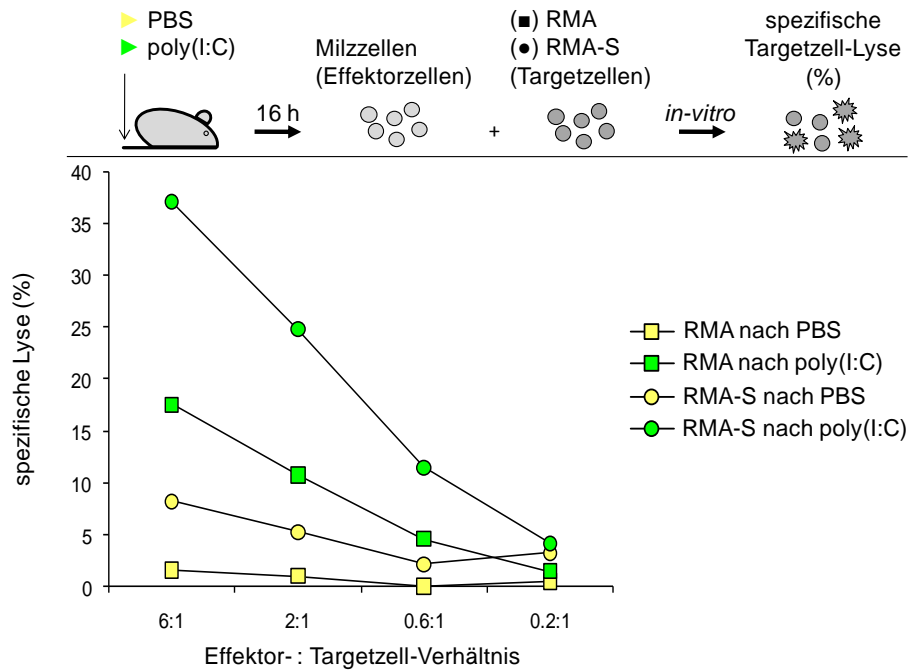


Abb. 18: Spezifische Lyse von RMA- und RMA-S-Zellen mit und ohne vorheriger *In-vivo*-Stimulation durch i.p.-Gabe von 100 μ g poly(I:C) (Stimulation) oder PBS (keine Stimulation), 16 Stunden vor Isolierung der Milzzellen und *in vitro* Targetzellkontakt. Markierung der Targetzellen und Ermittlung der spezifischen Lyse durch klassischen 51 Chrom-Freisetzungssassay in absteigenden Effektor- : Targetzell-Verhältnissen.

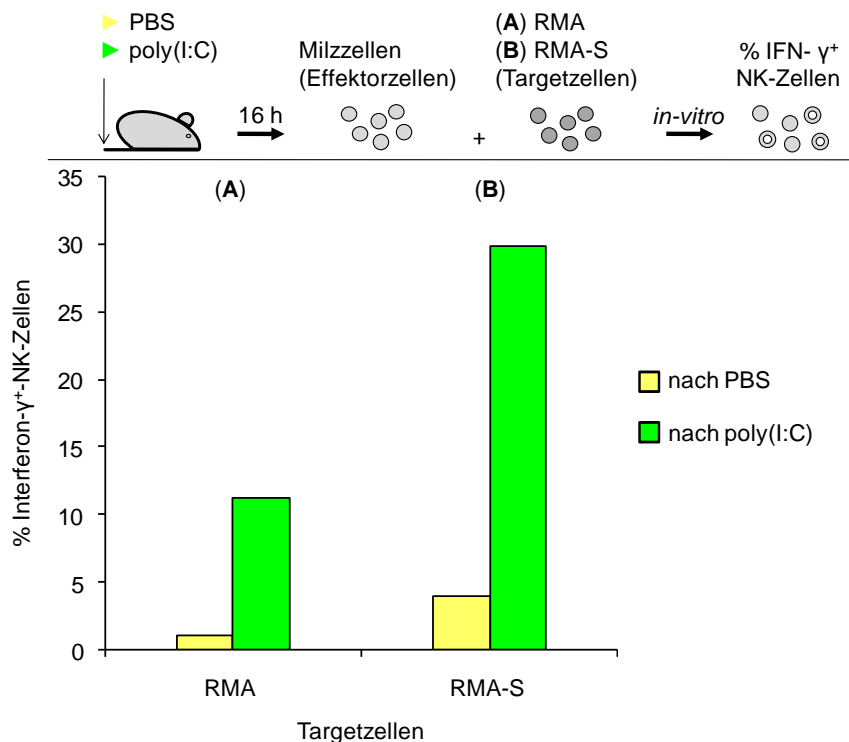


Abb. 19: Interferon- γ -Freisetzung mit und ohne vorheriger *In-vivo*-Stimulation durch i.p.-Gabe von 100 μ g poly(I:C) (Stimulation) oder PBS (keine Stimulation), 16 Stunden vor Isolierung der Milzzellen und *in vitro* Targetzell-Kontakt mit RMA- und RMA-S-Zellen. Ermittlung der IFN- γ -Freisetzung durch klassischen Interferon- γ -Freisetzungssassay.

3.6.2 Nach intravenöser Injektion von RMA- und RMA-S-Zellen zeigt sich die Lunge als das Organ mit der größten Tumorzelllast

Zur weiteren Untersuchung einer NK-Zell-Bahnung vor Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen wurde das etablierte *B2m*^{-/-}-Abstoßungsmodell auf RMA-S-Zellen als *In-vivo*-Targets übertragen. Analog zur intrazellulären CFSE-Markierung von *B2m*^{+/+}- und *B2m*^{-/-}-Zellen wurden hier nun Klasse I MHC-exprimierende RMA-Zellen CFSE^{low} und Klasse I MHC-defiziente RMA-S-Zellen CFSE^{high} markiert. So entstand ein vergleichbares Modell zweier Zellvarianten, die sich nur in ihrer MHC-I-Expression unterschieden und mithilfe unterschiedlich starker CFSE-Markierung differenziert werden konnten.

Mit der Übertragung des Abstoßungsmodells von *B2m*^{-/-} auf RMA-S-Zellen stellte sich die Frage, in welchen Organen sich die intravenös applizierten Lymphomzellen primär absiedeln, d.h. welches Organ für die weiteren Untersuchungen als Grundlage der Analyse dienen sollte. Zur Klärung dieser Frage wurden nach Injektion der CFSE-markierten Donorzellsuspensionen aus RMA- und RMA-S-Zellen und dem in diesem Modell auf zwei Stunden verkürzten Zeitintervall nicht nur Zellen der Milz, sondern auch der Lunge, der Leber und des Knochenmarks isoliert, um jeweils die lokale Tumorzelllast festzustellen. Dabei kamen drei Methoden zum Einsatz. Zunächst wurde das Gewicht von Lunge und Leber mittels Feinwaage bestimmt. Nach Aufschlüsselung der Organe und Isolation enthaltener Lymphozyten (einschließlich der markierten Lymphomzellen) konnte mittels mikroskopischer Zellzählung die Anzahl an Lymphozyten im jeweiligen Organ ermittelt werden. Als dritte und sensitivste Methode wurden die aus den Organen isolierten Lymphozytensuspensionen mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

Die Bestimmung des Organgewichtes und der jeweiligen Zellzahl ermöglichte keine Aussagen über die Menge an Tumorzellen im betreffenden Organ. Die Lungen tumorinjizierter Mäuse waren im Schnitt zwar schwerer und wiesen eine geringfügig größere Zellzahl auf, die Unterschiede untereinander sowie zur Kontrollgruppe nach volumengleicher PBS-Injektion erfüllten jedoch nicht die Signifikanzkriterien.

In der Durchflusszytometrie zeigten sich dagegen deutliche Unterschiede (Abb. 20). Die Lunge stellte sich dabei als das Organ mit der größten Tumorzelllast dar. In Mäusen mit zuvor injizierter RMA/RMA-Kombination zeigten sich in der auf vitale, CD45⁺ Lymphozyten selektionierten Population etwa 5% CFSE positiv. Da nur die Lymphomzellen zuvor mit CFSE markiert wurden, konnten sie eindeutig als solche identifiziert werden. Gemäß der Abstoßungstheorie von RMA-S-Zellen fand sich in Lungen von Mäusen, denen eine RMA/RMA-S-Kombination verabreicht wurde, eine geringere Tumorzelllast. Hier ließ sich ein prozentualer Anteil an der Lymphozytenpopulation von etwa 1,8% detektieren.

Im Vergleich zur Lunge fanden sich in allen weiteren untersuchten Organen deutlich weniger Lymphomzellen. Die Leber wies mit rund 1% nach RMA/RMA- bzw. 0,4% nach RMA/RMA-S-Applikation einen geringen Anteil an Tumorzellen auf. In Milz und Knochenmark lagen die entsprechenden Zellzahlen zwei Stunden nach Injektion unter der Nachweisgrenze.

Im Gegensatz zum Organgewicht und der jeweiligen mikroskopisch ermittelten Lymphozytenzahl zeigt die Durchflusszytometrie deutlich, dass sich Tumorzellen in diesem Assay größtenteils in den Lungen absiedeln. Für die Untersuchung der RMA-S-Abstoßung eignen sich daher von den untersuchten Organen die Lungen am besten. Zur Analyse der Abstoßungsreaktion ist die Durchflusszytometrie das Verfahren der Wahl.

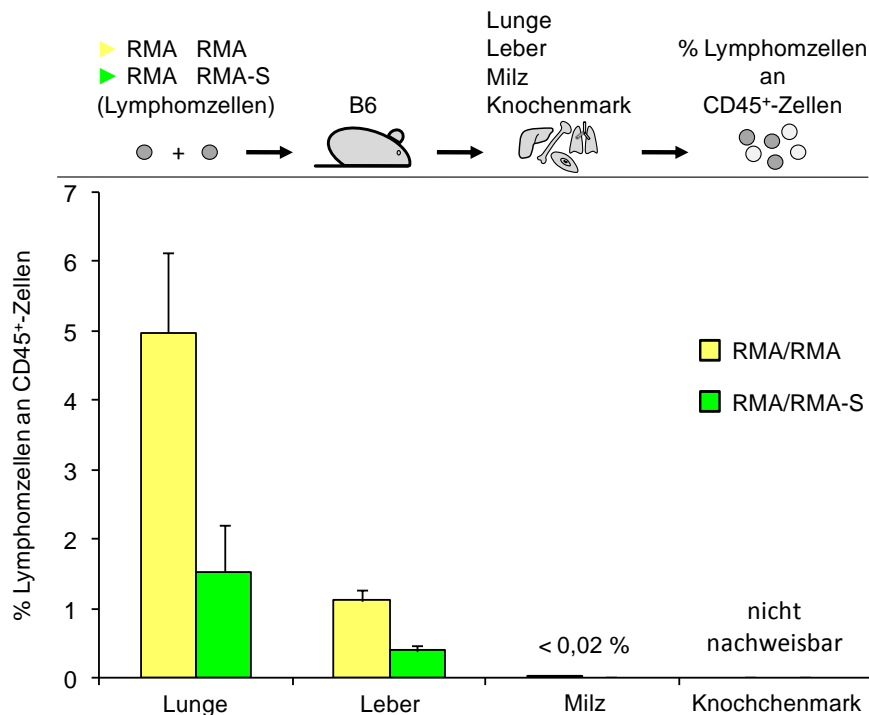


Abb. 20: Organabsiedlung von RMA- und RMA-S-Zellen im *In-vivo*-Abstoßungsassay, angegeben als prozentualer Anteil CFSE⁺-Zellen am jeweiligen Gesamtanteil CD45⁺-Lymphozyten aus Lunge, Leber, Milz und Knochenmark. RMA- und RMA-S-Zellen wurden intrazellulär mit CFSE markiert, im 1:1-Verhältnis von jeweils 10 Mio. Zellen in den Kombinationen RMA/RMA und RMA/RMA-S gemischt und als Zellsuspension i.v. injiziert. Ermittlung der Zellzahlen zwei Stunden nach Donorzellinjektion durch Lymphozytenisolation aus den Organen und durchflusszytometrischer Selektion auf vitale (DAPI-negative) CD45⁺CFSE⁺-Zellen.

3.6.3 Die *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen ist abhängig von NK-, nicht aber von NKT-Zellen

Um die NK-Abhängigkeit auch für die *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen nachzuweisen, wurden Untersuchungen mit NK-Zell-depletierten B6-Wildtypmäusen sowie mit Perforin- (*Prf1*^{-/-}) und NKT- (*Ja18*^{-/-}) defizienten Mäusen durchgeführt (Abb. 21). Im *In-vivo*-Abstoßungs-Modell mit RMA-S-Zellen wurde die Analyse aufgrund einer abweichenden Zeitkinetik in der Abstoßung von Lymphomzellen bereits zwei Stunden nach Donorzellinjektion durchgeführt.

Sowohl nach Depletion Natürlicher Killerzellen als auch in *Prf1*^{-/-}-Mäusen konnte keine optimale Abstoßung von RMA-S-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen erschien die Abstoßung in NKT-defizienten Mäusen gegenüber B6-Wildtypmäusen nicht eingeschränkt. Die Ergebnisse lassen daher darauf schließen, dass auch die Abstoßung von RMA-S-Zellen direkt von NK-Zellen abhängig ist. NKT-Zellen scheinen keinen Einfluss auf die Vorgänge zu haben.

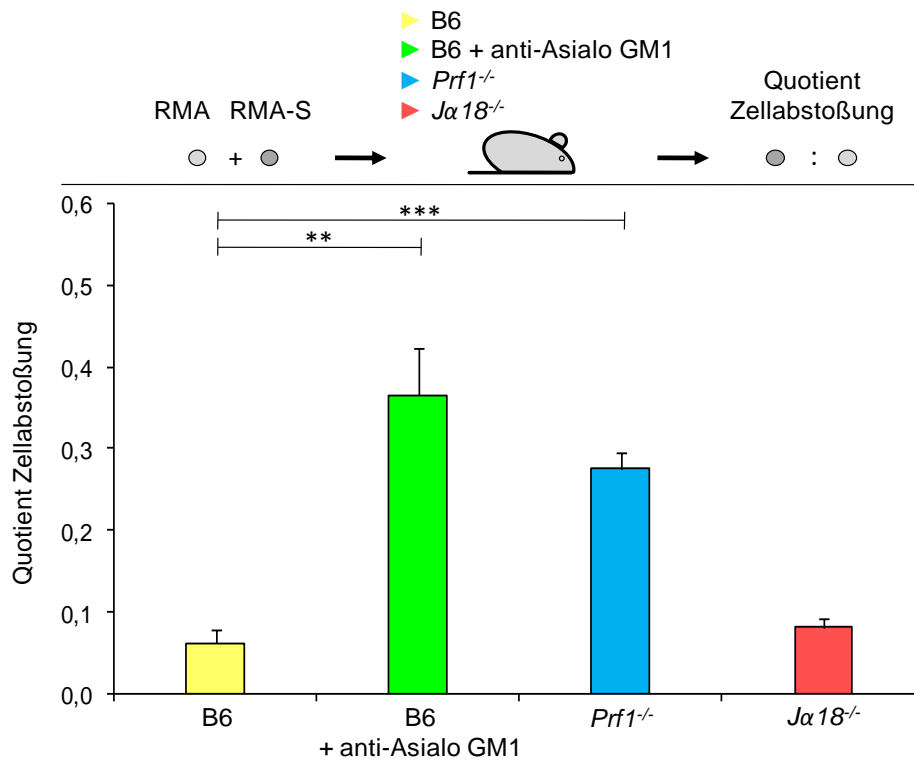


Abb. 21: *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen in Abhängigkeit der NK- und NKT-Funktion. Darstellung der Abstoßung in NK-depletierten B6-Mäusen nach i.p.-Gabe von Asialo GM1-Antiserum, 24 Stunden vor Donorzellinjektion sowie in Perforin- (*Prf1*^{-/-}) und NKT- (*Jα18*^{-/-}) defizienten Mäusen. Untersuchung der Abstoßung vier Stunden nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie die in Stern-Darstellung angezeigten Signifikanzniveaus, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (**p < 0,01; ***p < 0,001).

3.6.4 Die Depletion Dendritischer Zellen führt zu einer eingeschränkten *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen

Die dargestellten *In-vitro*-Befunde zur Abstoßungskompetenz unstimulierter Natürlicher Killerzellen gaben Anlass, auch für die *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen die Notwendigkeit vorheriger Bahnungsprozesse zu vermuten. Für den analogen Mechanismus zur Erlangung zytotoxischer Kompetenz gegenüber *B2m*^{-/-}-Zellen konnten Dendritische Zellen als essentieller Faktor identifiziert werden. Entsprechend wurde die Rolle Dendritischer Zellen auch im *In-vivo*-Abstoßungsmodell mit RMA-S-Zellen untersucht (Abb. 22). Dabei wurden ebenfalls CD11c-DTR^{Tg}-Mäuse verwendet, in denen CD11c⁺-Dendritische Zellen durch Gabe von Diptherie-Toxin depletiert werden konnten.

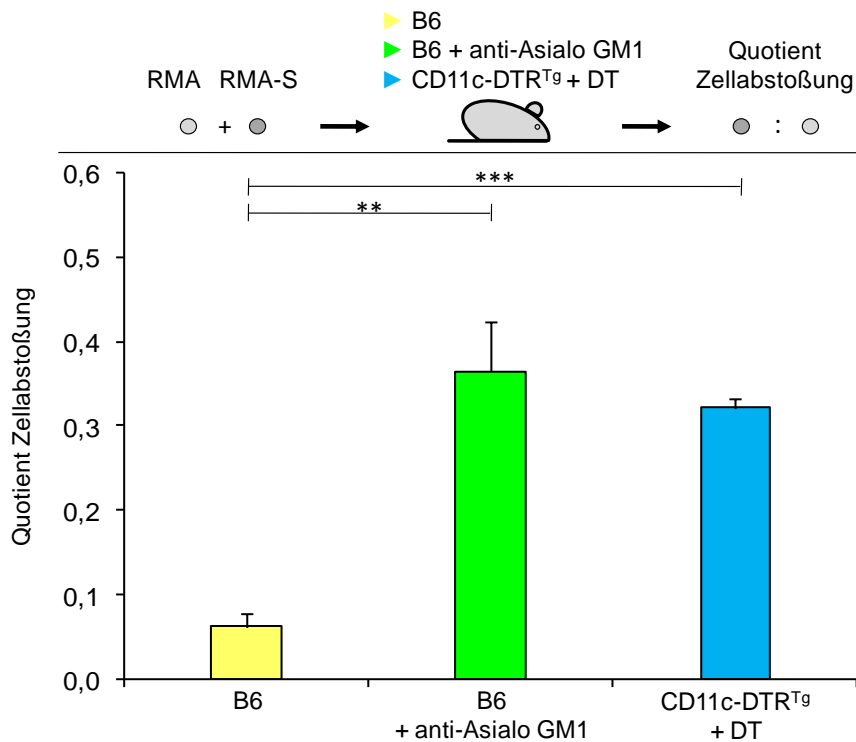


Abb. 22: Einschränkung der *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen in CD11c-DTR^{tg}-Mäusen nach Depletion Dendritischer Zellen. DC-Depletion durch i.p.-Gabe von 100 ng Diphterie-Toxin, 24 Stunden vor Donorzellinjektion. Kontrollgruppen mit B6-Wildtypmäusen und B6-Mäusen nach NK-Depletion durch i.p.-Gabe von Asialo GM1-Antiserum. Untersuchung der Abstoßung vier Stunden nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikatoren sowie die in Stern-Darstellung angezeigten Signifikanzniveaus, bezogen auf die Standardabstoßung in B6-Wildtypmäusen (**p < 0,01; ***p < 0,001).

Den Befunden im *B2m*^{-/-}-Abstoßungsmodell entsprechend, zeigte sich auch in der Abstoßung von RMA-S-Zellen der kritische Einfluss Dendritischer Zellen. So erreichten CD11c⁺ DTR^{tg}-Mäuse mit depletierten Dendritischen Zellen eine nur geringfügig stärkere Abstoßung von RMA-S-Zellen als B6-Mäuse mit depletierten NK-Zellen. Auch in diesem Modell entspricht die Depletion Dendritischer Zellen daher einem nahezu vollständigen Verlust der Effektorfunktion von NK-Zellen. Absolut gesehen konnte jedoch sowohl in NK-Zell- als auch in DC-depletierten Mäusen eine Abstoßung der RMA-S-Zellen von bis zu 50% beobachtet werden. Verglichen dazu erreichten B6-Wildtypmäuse zu diesem Zeitpunkt eine Abstoßung von etwa 90% der injizierten Klasse I MHC-defizienten Donorzellen.

3.6.5 Keine Einschränkung der *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen in *Ifnar*^{-/-}-Mäusen

Aufbauend auf den Erkenntnissen, dass auch für die Abstoßung von RMA-S-Zellen eine Bahnung der NK-Zellfunktion notwendig und eine Beteiligung Dendritischer Zellen dabei wahrscheinlich ist, wurden weitere in der *B2m*^{-/-}-Abstoßung als kritisch identifizierte Faktoren untersucht. Dazu zählte in erster Linie das Typ-I-Interferon-System. Entsprechend wurde auch der *In-vivo*-RMA-S-Abstoßungsassay mit *Ifnar*^{-/-}-Mäusen durchgeführt (Abb. 23).

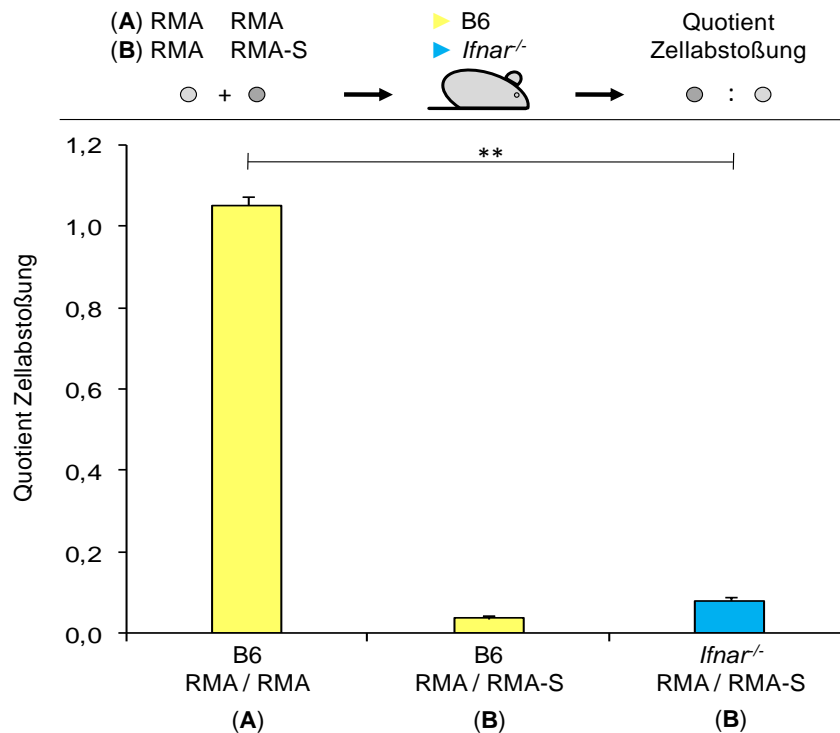


Abb. 23: In-vivo-Abstoßung von RMA-S-Zellen in *Ifnar*^{-/-}-Mäusen. Darstellung der Abstoßungsquotienten für (A) RMA-Zellen in B6-Wildtypmäusen (RMA/RMA) und (B) RMA-S-Zellen in B6-Wildtyp- und *Ifnar*^{-/-}-Mäusen (RMA/RMA-S). Untersuchung der Abstoßung vier Stunden nach Donorzellinjektion. Angegeben sind die entsprechenden Standardabweichungen als Fehlerindikator sowie das in Stern-Darstellung angezeigte Signifikanzniveau, bezogen auf die Kontrollgruppe in B6-Wildtypmäusen nach RMA/RMA-Injektion (**p < 0,01).

Gegensätzlich zu den Ergebnissen in der Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen, zeigte sich hier keine so deutliche Rolle des Typ-I-Interferon-Rezeptors. *Ifnar*^{-/-}-Mäuse konnten nur geringfügig schlechter RMA-S-Zellen abstoßen als ihre immunkompetenten B6-Counterparts. Da keine Kontrollen unter NK-Zell-Depletion mitgeführt wurden, gilt hier die (ebenfalls stets mitgeführte, in den vorangehenden Abbildungen jedoch nicht dargestellte) Kontrolle der RMA/RMA-Kombination als Referenz für nicht abgestoßene CFSE^{high}-markierte Zellen. Auch die wiederholte Untersuchung zur Beteiligung des Typ-I-Interferonrezeptors sprach gegen dessen Rolle in der NK-Zell-abhängigen Abstoßung von RMA-S-Zellen.

3.6.6 Weitere Faktoren in der In-vivo-Abstoßung von RMA-S-Zellen

Zusätzlich zu Dendritischen Zellen und dem Typ-I-Interferonsystem wurde die Beteiligung weiterer möglicherweise beteiligter Faktoren untersucht. Dazu zählten die auch im Rahmen des *B2m*^{-/-}-Abstoßungsmodells durchgeführten Untersuchungen an *Ticam1*^{-/-} (TRIF) und *IL-12p35*^{-/-}/*p40*^{-/-} (IL-12, IL-23, IL-35) Mäusen sowie zur Beurteilung der Rolle von Interferon- γ die Verwendung von *Ifng*^{-/-} (IFN- γ) und *Ifngr1*^{-/-} (IFN- γ -Rezeptor) Mäusen. Ebenfalls untersucht wurde die RMA-S-Abstoßung unter Depletion von Makrophagen sowie in *Tlr9*^{-/-} (TLR9) und *Tnf*^{-/-} (TNF- α) Mäusen. In keiner der zumeist wiederholt durchgeführten Untersuchungen zeigte sich eine signifikante Abstoßungsbeeinträchtigung von RMA-S-Zellen.

3.6.7 Die RMA-S-Abstoßung findet innerhalb von 24 Stunden statt

Während der genannten Untersuchungen zur Beteiligung verschiedener Faktoren an der *In-vivo*-Abstoßung von RMA-S-Zellen wurden Zeitpunkte von 2 bis 24 Stunden nach Donorzellinjektion betrachtet. Die Zusammenschau der Ergebnisse ergibt dabei einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der RMA-S-Abstoßung (Abb. 24). Als Grundlage für die Analyse dienten dabei die in jedem Experiment zur Kontrolle der regelrechten Abstoßung mitgeführten B6-Wildtypmäuse mit Injektion von RMA-S- bzw. RMA-Zellen. Dargestellt ist jeweils der Anteil CFSE^{high}-markierter RMA-S- bzw. RMA-Zellen am Gesamtanteil injizierter Donorzellen, d.h. als Anteil in der Kombination mit nicht abgestoßenen RMA-Zellen.

Im Gegensatz zur Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen, war die Abstoßung von RMA-S-Zellen stets bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nahezu vollständig abgeschlossen. Zwei Stunden nach Donorzellinjektion belief sich ihr Anteil an CFSE⁺-Zellen auf durchschnittlich noch 17%, was einer Abstoßung von etwa 65% entspricht. Zu Zeitpunkten über zwölf Stunden lag ihr Anteil bereits konstant unter 1%.

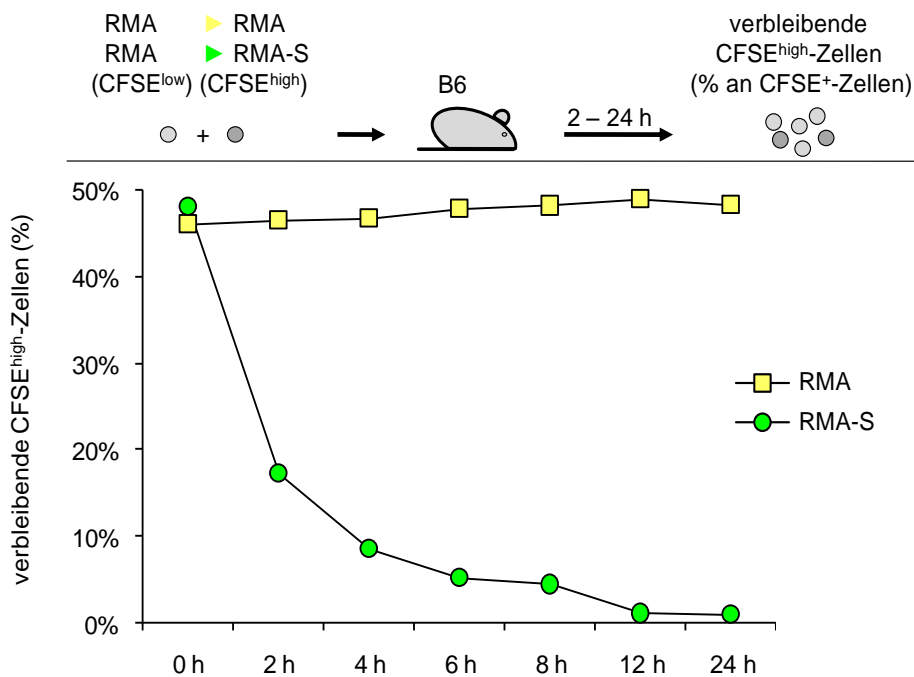


Abb. 24: Zeitkinetik der RMA-S-Abstoßung, dargestellt als prozentualer Anteil von CFSE^{high}-markierten (■) RMA- und (●) RMA-S-Zellen an der Gesamtmenge injizierter CFSE⁺-Lymphomzellen innerhalb der ersten 24 Stunden nach Donorzellinjektion. Werte am Zeitpunkt Null stellen die Anteile in den initialen Donorzellsuspensionen dar. Die Analyse basiert auf insgesamt 13 RMA-S-Abstoßungsassays mit jeweils verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Anzahl (n) der untersuchten B6-Mäuse pro Zeitpunkt und injizierter Zellkombination (RMA;RMA/RMA;RMA-S): 2h: n=24/28; 4h: n=22/22; 6h: n=16/19; 8h: n=3/1; 12h: n=6/6, 24h: n=3/3.

4 DISKUSSION

Der Name „Natürliche Killerzelle“ impliziert eine gewisse Autonomie und „Natürlichkeit“ in den Effektorfunktionen von NK-Zellen, die schon früh mit der Immunreaktion gegen virusinfizierte und tumortransformierte Zellen in Verbindung gebracht wurden (Trinchieri, 1989). Im Laufe weiterer Untersuchungen stellte sich jedoch zunehmend heraus, dass, trotz der Zurechnung zum angeborenen Immunsystem, Natürliche Killerzellen nicht derart zellautonom sind wie zunächst vermutet. Es mehrten sich die Nachweise, dass vor der effektiven Lyse von Targetzellen eine Bahnung der NK-Zellfunktion notwendig ist, deren genaue Mechanismen bislang aber nur im Zusammenhang mit Infektionen näher untersucht wurden (Long, 2007). Um die Frage zu klären, ob ähnliche bahnende Mechanismen auch in der Abwehr von Tumorzellen erforderlich sind, wurden in dieser Arbeit Untersuchungen vorgestellt, um die Notwendigkeit einer solchen vorgeschalteten Bahnung zu bestätigen und daran beteiligte Faktoren zu identifizieren. Dabei konnte die Lysekompetenz Natürlicher Killerzellen gegenüber Klasse I MHC-defizienten *B2m*^{-/-}-Zellen *in vitro* und *in vivo* begutachtet werden. Im Blickpunkt des *In-vivo*-Modells standen insbesondere die Rollen der Dendritischen Zellen, des Typ-I-Interferonsystems und von IL-12. Ergänzende Untersuchungen konnten mit ebenfalls Klasse I MHC-defizienten RMA-S-Zellen durchgeführt werden.

4.1 Die Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen findet abhängig von Natürlichen Killerzellen statt und verlangt vorausgehende *In-vivo*-Stimuli

4.1.1 NK-Zellen benötigen eine *In-vivo*-Aktivierung zur Erlangung vollständiger Lysekompetenz gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen

Als Grundlage dieser Arbeit galt es, zunächst zu zeigen, dass stimulierte und unstimulierte Natürliche Killerzellen *in vitro* ein unterschiedliches Maß an Effektorkompetenz gegenüber Targetzellen aufweisen. Im dazu durchgeführten ⁵¹Chrom-Freisetzungssassay konnte der Unterschied zwischen NK-Zellen aus unstimulierten gegenüber NK-Zellen aus vorstimulierten Mäusen deutlich gemacht werden. Letztere lysierten dabei sowohl *B2m*^{-/-}- als auch YAC-1-Zellen um ein Vielfaches stärker als NK-Zellen ohne vorherige *In-vivo*-Stimulation durch Gabe von poly(I:C). Diese Unterschiede in der Lysekompetenz von naïven und stimulierten NK-Zellen stehen im Einklang mit den Ergebnissen früherer vergleichbarer *In-vitro*-Untersuchungen (Bryceson et al., 2006; Höglund et al., 1991; Liao et al., 1991; Lucas et al., 2007; Ljunggren et al., 1988). Die Gruppen um Höglund und Liao klärten insbesondere die Frage, inwieweit das Merkmal einer fehlenden Klasse I MHC-Expression *in vitro* den Ausschlag geben kann, Zellen gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Lyse anfällig zu machen (Höglund et al., 1991; Liao et al., 1991). Dabei konnten sie die Thesen der „missing self“-Theorie (Kärre et al., 1986) bestätigen und genauer beschreiben. Weniger im Blickpunkt standen dabei die Gründe und

Mechanismen der dabei beobachteten Notwendigkeit einer vorherigen NK-Stimulation, die in dieser Arbeit genauer betrachtet werden sollen. Unsere Daten und diese Vordaten zeigen, dass NK-Zell-Aktivität nicht alleine durch zellautonome Programme reguliert ist, sondern dass NK-Zellen auf Signale von anderen Zellen angewiesen sind, um volle Funktionalität zu erlangen.

Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass auch die Stimulation der Targetzellen zu einer verstärkten Abstoßungsrate führt. Aus diesem Grund wurden für den hier dargestellten ⁵¹Chrom-Freisetzungssassay Concanavalin A-stimulierte T-Zell-Blasten als Targetzellen verwendet. Dass eine Verstärkung der Abstoßung durch Targetzellstimulation auch *in vivo* möglich ist, konnte durch Öberg et al. belegt werden (Öberg et al., 2004). Für die *In-vivo*-Versuche der vorliegenden Arbeit wurden dagegen unstimulierte *B2m*^{-/-}-Milzzellen verwendet, um die Frage zu untersuchen, ob die NK-Zell-medierte Abstoßung von Klasse I-MHC-negativen „Selbst“-Zellen ebenfalls durch NK-Zell-extrinsische Signale gebahnt werden muss.

Interessant ist die Beobachtung der unterschiedlichen Abstoßung von *B2m*^{-/-} und YAC-1-Zellen. Sowohl in der Gruppe der stimulierten als auch in der Gruppe der unstimulierten NK-Zellen zeigte sich stets eine stärkere Lyserate gegenüber den Lymphomzellen als gegenüber *B2m*^{-/-}-Zellen mit reiner Klasse I MHC-Defizienz. Auch diese Beobachtung entspricht den Resultaten von Höglund und Liao (Höglund et al., 1991; Liao et al., 1991). Dabei wird deutlich, dass eine Defizienz von Klasse I MHC durch den Wegfall der hemmenden Einflüsse zwar auch alleine ausreichen kann, NK-Zellen zur Lyse zu aktivieren, durch zusätzlich exprimierte aktivierende Liganden, wie etwa NKG2D-Liganden auf Tumorzellen, wie es bei YAC-1 der Fall ist, aber eine zum Teil erhebliche Steigerung der Lyserate ermöglicht wird. Dabei scheint die niedrige, aber bei weitem nicht vollständig aufgehobene Expression von inhibierenden Klasse I MHC-Molekülen auf YAC-1-Zellen keine entscheidende Rolle zu spielen (Piontek et al., 1985). Zudem muss angemerkt werden, dass auch die Zellen aus *B2m*^{-/-}-Mäusen durchaus noch eine Restexpression von Klasse I MHC-Komplexen aufweisen können (Raulet, 1994). Das unterschiedliche Potential von *B2m*^{-/-}-Zellen und Tumorzellen als NK-Zell-Target zu dienen, sollte daher in der Beurteilung der folgenden *In-vivo*-Untersuchungen dieser Arbeit berücksichtigt werden.

Der offenbare Unterschied zwischen sehr effizienter Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen durch NK-Zellen *in vivo* und deren fast kompletter Lyse-Resistenz *in vitro* könnte darin begründet liegen, dass apoptotischer Zelltod der übertragenen Zellen zu einer Aktivierung von NK-Zellen *in vivo* führt (Janssen et al., 2006). Um dieses Modell zu testen, wurden B6-Mäuse mit abgetöteten *B2m*^{-/-}-Zellen immunisiert. Anschließend wurde *in vitro* die Zytotoxizität ihrer NK-Zellen gegenüber klassischen Targetzellen überprüft. In diesem Fall wäre eine, verglichen mit nicht-immunisierten Mäusen, verstärkte Lyse der ebenfalls Klasse I MHC-armen YAC-1- und RMA-S-H60-Targetzellen zu erwarten. Die Analyse der Targetzellabstoßung zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

Bekräftigt werden diese Ergebnisse durch ähnliche Untersuchungen der Gruppe um Öberg et al., die ebenfalls B6-Mäusen *B2m*^{-/-} oder RMA-S-Zellen inokulierten, anschließend *in vitro* das Effektorpotential der NK-Zellen gegenüber *B2m*^{-/-}-Zellen als Targets überprüften und keinen Effekt beobachten konnten (Öberg et al., 2004).

Der Immunisierung mit apoptotischen Klasse I MHC-niedrigen oder -defizienten Zellen kann daher kein entscheidender Effekt auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zugewiesen werden. Es bleibt zu klären, warum *B2m*^{-/-}-Zellen fähig sind, den Aktivierungsmechanismus zur *In-vivo*-Lyse von Targetzellen zu initiieren, die NK-Aktivierung jedoch bei gleichartigem *In-vivo*-Kontakt mit *B2m*^{-/-}-Zellen *ex vivo* nicht mehr nachweisbar ist. Dagegen erscheint der *In-vivo*-Kontakt mit poly(I:C) als ausreichender Stimulus, so dass NK-Zellen auch *ex vivo* ihre zytotoxische Kompetenz erhalten. Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache sein, dass poly(I:C) einen deutlich stärkeren Stimulus darstellt als *B2m*^{-/-} bzw. apoptotische Zellen. Ebenfalls muss angemerkt werden, dass die Aktivierung durch poly(I:C) andere Signalwege nutzt als ein von phagozytierten apoptotischen Zellen ausgehender Stimulus (Janssen et al., 2006). Im Fall der *B2m*^{-/-}-Abstoßung erscheint unter Umständen ein dauerhafter Kontakt von NK-Zellen zu mediiierenden Faktoren oder Zellen notwendig zu sein.

4.1.2 Charakteristika der NK-Zell-abhängigen Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen

Im *In-vivo*-Modell der *B2m*^{-/-}-Zellabstoßung sollte zunächst der zeitliche Verlauf genauer betrachtet werden. Nach 48 Stunden lässt sich bereits eine deutliche Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen beobachten. An den Tagen vier und sechs nach Donorzellinjektion lassen sich dagegen nur noch wenige verbleibende Zellen nachweisen. Für die folgenden Untersuchungen zur Differenzierung einer regulären Zellabstoßung in B6-Wildtypmäusen gegenüber der Abstoßung in Knockout- bzw. zelldepletierten Mäusen kann daher ein Zeitintervall von etwa 72 Stunden als ideal angesehen werden. Fernandez et al. führten entsprechende Untersuchungen ebenfalls zu diesem Zeitpunkt durch (Fernandez et al., 2005). Zeitliche Abweichungen zu anderen Arbeiten mit vergleichbarem Assay bzw. Targetzellen sind entweder gering und liegen möglicherweise in der veränderten Menge initial applizierter Donorzellen begründet (Johansson et al., 2005; Öberg et al., 2004) oder ergeben sich aus einer vorgeschalteten Aktivierung durch infektiöse Stimuli (Kassim et al., 2009). Hinsichtlich der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unter einmaliger Gabe von Diphtherie-Toxin zur Depletion Dendritischer Zellen liegt ein Zeitfenster von 72 Stunden noch im Rahmen einer anhaltenden Depletion. Spätere Zeitpunkte würden dagegen bereits in die Erholungsphase Dendritischer Zellen fallen und so zu unscharfen Ergebnissen bezüglich der DC-Abhängigkeit führen oder eine mehrfache Applikation des Toxins nötig machen (Jung et al., 2002).

Die Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen gilt als NK-Zell-spezifische Funktion und wurde sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* bereits als solche beschrieben (Ljunggren and Kärre, 1990; Oberg et al., 2004). Zum Nachweis der NK-Zell-Abhängigkeit des hier verwendeten *In-vivo*-Modells wurden bei allen Untersuchungen stets Kontrollen unter Depletion Natürlicher Killerzellen mitgeführt. Die Depletion fand dabei entweder durch Gabe von NK1.1-Antikörpern (PK136) oder Asialo GM1-Antiserum statt und wurde durchflusszytometrisch kontrolliert (Abb. 13; Kasai et al., 1980; Seaman et al., 1987). Beide Marker gelten als vergleichsweise spezifisch für NK-Zellen, finden sich aber dennoch auch auf anderen Zellen, wie beispielsweise aktivierten T-Zellen und NKT-Zellen (Slifka et al., 2000). Insbesondere letztere stehen Natürlichen Killerzellen funktionell nahe. So sind Typ-I NKT-Zellen als Effektorzellen an der Tumorzellabstoßung beteiligt (Kawano et al., 1998) und spielen darüber hinaus durch Freisetzung von IFN- γ eine Rolle in der Reifung Dendritischer Zellen (Berzofsky and Terabe, 2008). Sowohl durch die direkte Wirkung auf Targetzellen als auch durch ihr Eingreifen in immunmodulatorische (und unter Umständen NK-Zell-aktivierende) Regelkreise darf ihr Einfluss nicht unterschätzt werden, der im Rahmen der NK-Zell-Depletion jedoch ebenfalls theoretisch entfallen könnte. NKT-Zellen gelten gegenüber Asialo GM1-Antiserum allerdings nicht als anfällig für eine Depletion. Um mit vollständiger Sicherheit einen Beitrag von NKT- und T-Zellen an der Abstoßung von $B2m^{-/-}$ -Zellen im dargestellten *In-vivo*-Modell auszuschließen, könnten sich dennoch Untersuchungen in $Rag1^{-/-}$ Mäusen anschließen, da diese für T-, B- und NKT-Zellen, nicht jedoch für NK-Zellen, eine Defizienz aufweisen. Alternativ wäre eine Untersuchung in selektiv für NKT-Zellen defizienten $J\alpha 18^{-/-}$ -Mäusen denkbar. Entsprechend kann das hier verwendete Modell als NK-Zell-abhängig angesehen werden, da NKT-Zellen nicht wesentlich depletiert werden und lediglich einen kleinen Teil möglicher Effektorzellen ausmachen (Slifka et al., 2000). Darüberhinaus gelten $B2m^{-/-}$ -Zellen als klassisches Target für NK-Zellen, nicht jedoch für NKT-Zellen.

Die in allen Experimenten applizierte Suspension aus CFSE^{low}- und CFSE^{high}-markierten $B2m^{+/-}$ -Zellen dient der Kontrolle toxischer Wirkungen durch die intrazelluläre Markierung. Da auch CFSE^{high}-markierte $B2m^{+/-}$ -Zellen nicht abgestoßen werden, kann ein Verlust entsprechend markierter Zellen aufgrund eines schädigenden Einflusses der höheren CFSE-Dosis ausgeschlossen werden. Der Verlust von CFSE^{high}-markierten $B2m^{-/-}$ -Zellen kann daher der lytischen Wirkung zellvermittelter Abstoßung zugeschrieben werden.

4.2 Dendritische Zellen spielen eine Schlüsselrolle in der Abstoßung Klasse I MCH-defizienter Zellen

$B2m^{-/-}$ -Zellen werden *in vitro*, wie *in vivo* NK-Zell-abhängig abgestoßen. Das eingeschränkte Effektorpotential der NK-Zellen *in vitro* ohne vorherige *In-vivo*-Stimulation deutet dabei auf die Notwendigkeit vorheriger Bahnungsprozesse hin. Welche sind aber die kritischen Faktoren, mithilfe

deren NK-Zellen ihre vollständige Lysekompetenz gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen erlangen können? Um diese Frage zu klären, wurde die Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen in Mäusen untersucht, die selektiv Defizienzen für bestimmte und bekanntermaßen NK-Zell-regulierende Faktoren aufwiesen. Insbesondere Dendritische Zellen stehen in engem Austausch mit NK-Zellen und spielen erfahrungsgemäß eine Schlüsselrolle in deren Regulierung (Walzer et al., 2005). Um ihren postulierten Einfluss vor einer *B2m*^{-/-}-Zellabstoßung beurteilen zu können, wurden Untersuchungen mit transgenen Mäusen durchgeführt, in denen es möglich war, selektiv CD11c⁺ Zellen und damit insbesondere Dendritische Zellen zu depletieren. Die Ergebnisse belegen die enorme Wichtigkeit dieser immunmodulatorischen Zellen: Nach DC-Depletion konnten NK-Zellen nicht annähernd ein Maß an Zytotoxizität erreichen, wie es in Wildtypmäusen zu beobachten war. Vielmehr glich das Fehlen Dendritischer Zellen einer kompletten Depletion von NK-Zellen selbst.

In-vitro-Untersuchungen deuteten bereits früh an, welche kritische Rolle Dendritische Zellen in der Regulierung von NK-Zellen spielen. Fernandez *et al.* zeigten als erste, dass zwischen den beiden Zellarten eine enge Verbindung bestehen müsse, um murine NK-Zellen zu aktivieren (Fernandez et al., 1999). Vergleichbare Ergebnisse bezüglich der Abhängigkeit von Dendritischen Zellen und dem notwendigen Zellkontakt zu ihnen ergaben sich auch für die Funktionsbahnung humaner NK-Zellen (Ferlazzo et al., 2002; Gerosa et al., 2002; Piccioli et al., 2002). Darauf folgende Arbeiten *in vivo* bekräftigten fortan das Bild, dass NK-Zellen für eine optimale Effektorfunktion auf die Anwesenheit Dendritischer Zellen angewiesen sind (Andrews et al., 2003; Schleicher et al., 2007) und entschlüsselten entscheidende dabei wirkende Mechanismen des sogenannten *Primings* (Lucas et al., 2007). Wenn auch oft breit gefasst, bezogen sich die Untersuchungen dennoch in aller Regel auf Situationen, in denen Dendritische Zellen infolge eines Infektionsstimulus zur Reifung angeregt wurden und zu einem *Priming* der NK-Zellen führten. Weitgehend offen blieb dagegen bislang die Frage, welche Voraussetzungen die Bahnung von NK-Funktionen für Situationen verlangt, in denen kein mikrobiologisches Pathogen, bzw. klassische TLR-Liganden als auslösende Faktoren zugegen sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun, dass Dendritische Zellen, auch im Rahmen der Abstoßung tumorähnlicher Zellen, eine kritische Rolle spielen. Die an dieser NK-Zell-Bahnung beteiligten molekularen Mechanismen könnten sich dabei jedoch grundlegend unterscheiden.

4.2.1 Zwei mögliche Mechanismen zur Bahnung der NK-Zell-Effektorfunktion

Welche Mechanismen dem Zusammenhang zwischen Dendritischen Zellen und der vorliegenden Bahnung von NK-Zell-Effektorfunktionen zugrunde liegen, kann anhand der Ergebnisse nicht eindeutig geklärt werden. Vergleichend mit vorangehenden Untersuchungen sind jedoch mindestens zwei Abläufe denkbar, bei denen Dendritische Zellen entweder eine zentrale Rolle in Form eines NK-Zell-*Primings* oder aber in der Reifung von NK-Zellen spielen.

4.2.1.1 Dendritische Zellen im Priming Natürlicher Killerzellen

Zum Einen ließe sich ein Mechanismus vermuten, bei dem Dendritische Zellen, ähnlich des *Primings* in der Abwehr infizierter Zellen (Lucas et al., 2007), auch hier eine Funktionsbahnung Natürlicher Killerzellen ermöglichen. Das heißt NK-Zellen werden erst durch den engen Kontakt mit Dendritischen Zellen in die Lage versetzt, auf die Signale der Targetzellen zu reagieren, sprich aktiviert zu werden und mit einer Targetzelllyse zu antworten. Auslösender Stimulus für Dendritische Zellen wäre in diesem Fall keine Ligandenbindung an TLR-Rezeptoren, sondern die Phagozytose zugrunde gehender Targetzellen. Sowohl *B2m^{+/+}*- als auch *B2m^{-/-}*-Milzzellen zeigen nach Isolation und folgendem *In-vivo*-Transfer in Akzeptormäuse ein deutliches apoptotisches Potential. Inwieweit Dendritische Zellen durch eine solche Phagozytose angeregt werden, ist abhängig von der Art des Zelltodes der phagozytierten Zellen (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000; Janssen et al., 2006). Zelltod infolge regelrechter Apoptose stellt einen permanenten Vorgang im kontinuierlichen Turnover der Zellen eines Organismus dar. Ihre Phagozytose dient dabei der Präsentation des „Selbst“ und damit Aufrechterhaltung der Toleranz des adaptiven Immunsystems gegenüber körpereigenen Zellen. Die Phagozytose nach Zelltod infolge Stress, Infektion oder Tumorveränderung bedingt dagegen eine Aktivierung der Dendritischen Zellen und ermöglicht die Initiierung einer Immunantwort. Die im vorliegenden Abstoßungsmodell transferierten Milzzellen sind weder infiziert noch tumorverändert. Unterstellt man ihnen jedoch ein gewisses Maß an zellulärem Stress, kann ihre Phagozytose ebenfalls als aktivierender, wenn auch vergleichsweise schwacher Reiz für Dendritische Zellen angesehen werden. Vergleichbar der im Rahmen des NK-Zell-*Primings* nach TLR-Stimulation untersuchten Mechanismen könnten Dendritische Zellen auch hier zur Reifung angeregt werden und ein *Priming* von NK-Zellen initiieren. In diesem Fall würden Dendritische Zellen einen integralen Bestandteil NK-bahnender Mechanismen darstellen, an deren Beginn die injizierten, apoptotischen Targetzellen selbst ständen.

4.2.1.2 Dendritische Zellen in der Reifung Natürlicher Killerzellen

Ein weiterer Grund für die Abhängigkeit der NK-Zell-Funktionalität von Dendritischen Zellen im vorliegenden Modell könnte in einer Beobachtung von Mortier *et al.* liegen (Mortier et al., 2009). Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Entwicklung von CD11b^{high}CD27^{high}- zu CD11b^{high}CD27^{low}-NK-Zellen von IL-15-Signalen und damit der Präsenz Dendritischer Zellen und Makrophagen abhängig ist. Die Depletion Dendritischer Zellen könnte daher nicht nur den Verlust der antigenpräsentierenden Zellen selbst, sondern auch den Verlust eben dieser Reifungsstufe Natürlicher Killerzellen zur Folge haben. In diesem Fall wären Natürliche Killerzellen zwar nicht in Bezug auf ihr *Priming*, dafür aber bezüglich des Erreichens ihrer reiferen Entwicklungsstufe von Dendritischen Zellen abhängig. Tatsächlich wird genau diese reifere CD27^{low}-Entwicklungsstufe als diejenige NK-Zell-Subpopulation angesehen, die den Hauptteil im peripheren Blut und Gewebe darstellt und insbesondere auf die

Differenzierung von Selbst- gegenüber Fremdanigenen spezialisiert ist. Deutlich wird dies in der, verglichen mit anderen NK-Subpopulationen, ausgeprägtesten Expression der Klasse I MHC-sensitiven und dadurch NK-Zell-inhibierenden Ly49C- und Ly49I-Rezeptoren (Hayakawa and Smyth, 2006). Diese auf „missing self“-Signale spezialisierten NK-Zellen entwickeln sich dabei aus reifen CD27^{high}-Zellen, die ihrerseits wiederum als diejenigen NK-Zellen mit dem intensivsten Crosstalk zu Dendritischen Zellen gelten. Entsprechend stellen sie auch den höchsten Anteil Natürlicher Killerzellen im lymphatischen Gewebe dar (Hayakawa and Smyth, 2006). Eine Depletion Dendritischer Zellen würde demnach das Zusammenspiel mit CD27^{high}-NK-Zellen unterbinden und deren weitere Reifung zu CD27^{low}-NK-Zellen verhindern. Inwieweit eine Reduktion der CD27^{low}-Fraktion wirklich Bedeutung für die Effektorfunktion gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen hat, bedarf weiterer Klärung. Ihre Aktivität wird kontrovers diskutiert, jedoch zumeist niedriger als die der CD27^{high}-Population eingeschätzt (Hayakawa and Smyth, 2006; Joncker et al., 2010; Vahlne et al., 2008). Dabei wurden die Aktivitätsuntersuchungen allerdings meist nach Gabe von TLR- oder NKG2D-Liganden und nicht gegenüber Klasse I MHC-defizienten Zellen durchgeführt.

Fraglich bleibt auch, ob die in dieser Arbeit durchgeführte viertägige Depletion Dendritischer Zellen bzw. der damit einhergehende Entzug von IL-15-Signalen eine ausreichend lange Dauer darstellt, um NK-Zell-Reifungsprozesse derart zu beeinflussen, dass sie sich als Einschränkungen in der reiferen NK-Zell-Population bemerkbar machen. Zu klären wäre dies mit einer quantitativen Verlaufsbeobachtung der CD27^{low}-NK-Population nach Depletion Dendritischer Zellen.

4.2.2 Einflussnehmende Mechanismen unabhängig von Dendritischen Zellen

Als Ursache der eingeschränkten Effektorkompetenz ist ein direkter NK-Zell-toxischer Effekt durch das im Rahmen der DC-Depletion verwendete Diphtherie-Toxin (DT) nicht vollständig auszuschließen, wenngleich murine Zellen allgemein als weitestgehend resistent gegen die verwendeten DT-Dosen beschrieben werden (Hochweller et al., 2008; Jung et al., 2002; Saito et al., 2001) und sich sowohl der Gesamtanteil als auch rezeptordefinierte Subpopulationen Natürlicher Killerzellen nach DT-Injektion nicht signifikant verändern (Lucas et al., 2007). Die Kontrolle der *B2m*^{-/-}-Abstoßungskompetenz von B6-Wildtypmäusen nach Behandlung mit äquivalenten DT-Dosen könnte dabei einen Einfluss des Diphtherie-Toxins auf NK-Zellen auch für das vorliegende Modell widerlegen. Sicher dagegen ist, dass in transgenen Mäusen nach DT-Gabe NK-Zellen mit CD11c^{high}-Expression vollkommen und solche mit CD11c^{int}-Expression teilweise ebenfalls depletiert werden. Aufgrund des sehr niedrigen Anteils derart depletierter NK-Zellen kann dieser Einfluss vernachlässigt werden (Hochweller et al., 2008).

Neben Dendritischen Zellen und wenigen NK-Zellen exprimieren auch bestimmte Subpopulationen von Makrophagen CD11c und fallen daher genauso der Depletion zum Opfer (Probst et al., 2005).

Bekannt ist, dass Makrophagen den IL-15-Rezeptor- α , einen zentralen Rezeptor zur *trans*-Präsentation von IL-15, im Rahmen des DC-NK-Crosstalks ebenfalls exprimieren und in der Lage sind, Natürliche Killerzellen zu aktivieren (Chang et al., 1990; Lapaque et al., 2009; Mortier et al., 2009). Zumindest ein anteiliger Beitrag der Makrophagen an einer Effektorbahnung der NK-Zellen kann daher aufgrund der gleichsam Depletion formal nicht ausgeschlossen werden. Dieser Beitrag wäre allerdings gering, da gezeigt wurde, dass die Anwesenheit von Makrophagen alleine nicht ausreicht, um eine Aktivierung Natürlicher Killerzellen zu initiieren, sie einen Ausfall Dendritischer Zellen also nicht kompensieren können (Mortier et al., 2009). Insbesondere durch die Beobachtung der zeitlichen Depletionskinetik konnte eine entscheidende Rolle der Makrophagen zumindest am untersuchten *Priming* im Kontext von Infektionen praktisch ausgeschlossen werden (Lucas et al., 2007). Auch wenn anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ein Einfluss von Makrophagen also nicht widerlegt werden kann, macht der Vergleich mit den analogen Untersuchungen ihre Rolle im betrachteten Mechanismus daher dennoch unwahrscheinlich. Zur letztlichen Klärung der Frage bietet es sich jedoch an, Untersuchungen nach Clodronat-Injektion zur selektiven Depletion von Makrophagen anzuschließen (Van Rooijen and Sanders, 1994).

Von der Depletion nicht erfasst werden dagegen plasmazytoide Dendritische Zellen mit niedriger CD11c-Expression (Probst et al., 2005). Da sich aber dennoch die beschriebenen Einschränkungen in der NK-Zell-Effektorfunktion beobachten ließen, erscheint diese, für die ausgeprägte Produktion von Typ-I-Interferonen bekannte Gruppe an Dendritischen Zellen, keine entscheidende Rolle in den betrachteten Bahnungsmechanismen Natürlicher Killerzellen zu spielen.

4.3 Das Typ-I-Interferon-System trägt entscheidend zur Funktionbahnung Natürlicher Killerzellen bei

Dendritische Zellen nehmen eine zentrale Rolle in der Regulierung Natürlicher Killerzellen ein. Auch für den in dieser Arbeit betrachteten Mechanismus zur Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen konnte ihre Bedeutung weiter untermauert werden. Dies war ein unerwarteter Befund, da eine Abhängigkeit von Dendritischen Zellen auch bei der Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Milzzellen beobachtet wurde. *B2m*^{-/-}-Milzzellen sind immunologisch gesehen „Selbst“-Zellen und es bleibt zu klären, wie diese zur Aktivierung von Dendritischen Zellen führen können. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen galt es zu entschlüsseln, welche die kritischen Mediatoren sind, die den hier vorliegenden Crosstalk zwischen Dendritischen Zellen und NK-Zellen ermöglichen. Dabei gelten insbesondere Typ-I-Interferone und IL-15 sowie IL-12 und IL-18 als wichtigste Zytokine der NK-Zell-Regulierung und -Aktivierung (Walzer et al., 2005). Für Typ-I-Interferone wird neben der direkt aktivierenden Wirkung auf NK-Zellen (Djeu et al., 1979; Gidlund et al., 1978; Haeberlein et al., 2010; Santoli et al., 1978), in einigen Modellen auch die indirekte Wirkungen, z.B. durch Stimulation Dendritischer Zellen,

hervorgehoben (Akazawa et al., 2007; Lucas et al., 2007), sodass auch für den vorliegenden Mechanismus eine Beteiligung von Typ-I-Interferonen vermutet werden konnte.

Alle Interferone dieser Klasse nutzen als gemeinsamen Rezeptor den Typ-I-Interferon-Rezeptor (IFNAR). Wird die Signaltransduktion durch Ausschalten des Rezeptors unterbunden, kann eine Abhängigkeit von den betroffenen Zytokinen analysiert werden. *Ifnar*^{-/-}-Mäuse waren nicht in der Lage, *B2m*^{-/-}-Milzzellen abzustößen. Daher konnte das Typ-I-Interferonsystem hier klar als kritischer Faktor für die *In-vivo*-Abstoßung Klasse I-MHC-defizienter Zellen identifiziert werden. Vergleichbar mit der Situation im *Priming* nach verschiedenen Infektionsstimuli, haben Typ-I-Interferone also auch in der Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen eine Schlüsselfunktion inne. Hauptvertreter der Typ-I-Interferone sind IFN- α und IFN- β . Letzteres wird insbesondere infolge Kontakt mit dsRNA oder LPS durch Stimulation von TLR3- oder TLR4-Rezeptoren und folgender intrazellulärer Signalkaskade über TRIF sezerniert (Dalod et al., 2002). Interferon- β wird dabei durch ein einzelnes Gen kodiert, sodass es möglich ist, Mäuse mit selektivem Knockout zu erzeugen. Dagegen ist ein Knockout für IFN- α nicht möglich, da dieses von 14 verschiedenen funktionellen Genen kodiert wird (van Pesch et al., 2004). Der Einfluss von IFN- α kann daher nur im Zusammentreffen einer Typ-I-IFN-Abhängigkeit bei gleichzeitiger IFN- β -Unabhängigkeit beurteilt werden.

Um innerhalb der beiden Typ-I-Interferone genauer differenzieren zu können, wurden daher weitere Untersuchungen an *Ifnb1*^{-/-} und *Ticam1*^{-/-}-Mäusen durchgeführt. Beide Knockouts zeigten keine Beeinflussung in ihrer Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen. Sowohl IFN- β selbst als auch TRIF, als Bestandteil des wichtigsten Induktionsweges für IFN- β , erscheinen daher in diesem Zusammenhang als nicht essentiell, sodass die kritische Rolle der Typ-I-Interferone den IFN- α s zugeschrieben werden kann. Die Bedeutung von IFN- α wird durch *In-vitro*-Beobachtungen in Ko-Kulturen von Dendritischen Zellen mit NK-Zellen unterstützt, bei denen sich IFN- α als zentrales Zytokin zur Stimulation der Dendritischen Zellen und darauffolgender NK-Zell-Aktivierung herausstellte (Jinushi et al., 2003a).

Eine der insgesamt dreifach durchgeführten Untersuchungen zur Bestätigung der hier dargestellten Ergebnisse zeigte auch für *Ifnb1*^{-/-}-Mäuse eine eingeschränkte Abstoßungskompetenz. Aufgrund der widersprüchlichen Resultate ist es daher notwendig weitere Experimente folgen zu lassen, um die Fragen nach einer IFN- α - oder IFN- β -Abhängigkeit abschließend klären zu können. Denkbar wäre in diesem Rahmen auch eine Durchführung des *In-vivo*-Abstoßungsmodells in *Myd88*^{-/-}-Mäusen. MyD88 stellt eine zentrale Schaltstelle im Signalweg zur Induktion der IFN- α -Sekretion dar und würde bei eingeschränkter Abstoßungskompetenz in *Myd88*^{-/-}-Mäusen für IFN- α als wichtigstes Typ-I-Interferon im dargestellten Setting sprechen.

In welche funktionellen Abläufe die Typ-I-Interferone als Mediatoren in die NK-Zell- und DC-abhängige Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen gebracht werden können, kann auf Basis der vorliegenden Ergebnisse nur vermutet werden. Denkbare Erklärungen ergeben sich dabei unter Berücksichtigung der für Dendritische Zellen dargestellten Rollen im Crosstalk mit Natürlichen Killerzellen. Sowohl an einer DC-abhängigen Reifung Natürlicher Killerzellen als auch einem DC-abhängigen *Priming* ist eine Beteiligung von Typ-I-Interferonen vorstellbar.

Geht man davon aus, dass es auch ohne initialen Stimulus stets zu einer basalen Sekretion von Typ-I-Interferonen kommt (Belardelli et al., 1987; Montoya et al., 2002), bedeutet dies, dass Dendritische Zellen zu einer geringen, aber kontinuierlichen IL-15-*trans*-Präsentation angeregt werden. Diese dauerhaften Signale wären Voraussetzung zur DC-vermittelten Aufrechterhaltung der reifen CD27^{low}-NK-Zell-Population (Mortier et al., 2009). Der Ausfall von Typ-I-Interferonen könnte dazu führen, dass diese Homöostase gestört wird, Dendritische Zellen weniger IL-15 präsentieren und dadurch der Anteil reifer CD27^{low}-NK-Zellen abnimmt. Die Folge wäre eine Verschiebung der NK-Zell-Subpopulationen hin zu CD27^{high}-Entwicklungsstufen, was unter den gegebenen Umständen die beobachtete Einschränkung im Effektorpotential gegenüber den Klasse I MHC-defizienten Zielzellen erklären könnte.

Auch ein DC-abhängiges NK-Zell-*Priming* könnte durch ein fehlendes Typ-I-Interferon-Signal gestört sein. Aufgrund des nur schwachen Reizes durch die Phagozytose apoptotischer Zellen ist es möglich, dass Dendritische Zellen zur weiteren Reifung auf zusätzliche Stimuli angewiesen sind (Gallucci et al., 1999; Sauter et al., 2000), die entweder von extern oder durch sie selbst im Rahmen autokriner Aktivierung bereit gestellt werden (Montoya et al., 2002). Handelt es sich bei diesen zusätzlichen Stimuli um Typ-I-Interferone, so würde deren Fehlen trotz Phagozytose der apoptotischen Zellen zu einer unzureichenden Reifung Dendritischer Zellen, einem reduzierten NK-Zell-Primingsignal und folglich mangelnder NK-Zell-Effektorfunktion führen. Um diese Theorie zu bestätigen, muss jedoch geklärt werden, welche Zellen die Typ-I-Interferone produzieren bzw. auf welchen Reiz hin sie dies tun und welche Zellen auf das Typ-I-IFN-Signal reagieren, d.h. welche Zellen durch den Wegfall des Interferonrezeptors beeinträchtigt werden. Inwieweit solche Mechanismen dem *Priming* nach TLR-Stimulation entsprechen, d.h. auf der Expression des IL-15-Rezeptors und von IL-15 selbst beruhen, bleibt offen für weitere Untersuchungen.

4.4 Die Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen ist unabhängig von den Interleukinen 12, 23 und 35

Interleukin 12 (IL-12) ist ein durch Disulfidbrücken kovalent verbundenes Heterodimer aus einer 35 kD- (p35) und einer 40 kD- (p40) schweren Untereinheit (Kobayashi et al., 1989). In Verbindung

mit dem 19 kD schweren Protein p19 kann die p40-Untereinheit darüber hinaus auch Interleukin 23 (IL-23), ein dem IL-12 ähnliches Zytokin, bilden (Oppmann et al., 2000). Ein weiteres heterodimeres Zytokin der IL-12-Familie, das Interleukin 35 (IL-35), setzt sich aus der Verbindung zwischen der p35-Untereinheit als α - und der EBI3-Untereinheit als β -Kette zusammen (Collison et al., 2007). *IL12p35^{-/-}p40^{-/-}*-Mäuse sind daher nicht nur in ihrer Bildung von Interleukin 12, sondern auch von Interleukin 23 und Interleukin 35 defizient (Collison and Vignali, 2008).

Bereits die frühere Bezeichnung von Interleukin 12 als „Natural killer cell stimulating factor“ deutet auf seine zentrale Bedeutung in der Aktivierung Natürlicher Killerzellen hin (Robertson et al., 1992). Sowohl infolge bakterieller (Gerosa et al., 2002) als auch viraler (Dalod et al., 2003; Degli-Esposti and Smyth, 2005; Gerosa et al., 2005) Stimuli konnte in den verschiedensten *In-vitro*-Modellen die aktivierende Wirkung des Zytokins auf NK-Zellen nachgewiesen werden. Manche *In-vivo*-Modelle zeigten gar eine essentielle Rolle des Interleukins 12, sodass bei dessen Ausschaltung die Interferon- γ -Produktion und Zytotoxizität der NK-Zellen (Magram et al., 1996) und in der Folge die Abwehr bestimmter Pathogene wie Leishmanien (Schleicher et al., 2007) nicht kompensierbar eingeschränkt war. Andere Arbeiten *in vivo* beurteilten die Rolle des untersuchten Interleukins dagegen als nicht essentiell (Akazawa et al., 2007; Granucci et al., 2004; Kassim et al., 2009). Lucas *et al.* differenzierten dabei genauer und hoben hervor, dass IL-12 zwar die Interferon- γ -Produktion der NK-Zellen steigern kann, für deren *Priming* jedoch nicht notwendig sei (Lucas et al., 2007).

Auch in der Abwehr Klasse I MHC-defizienter Zellen zeigt sich ein uneinheitliches Bild der IL-12-Abhängigkeit. Auf der einen Seite konnte eine kritische Rolle für IL-12 zur Aktivierung von NK-Zellen gegenüber subkutan inokulierten RMA-S-Lymphomzellen nachgewiesen werden, wenngleich eine geringe Tumorzelllast auch ohne die Anwesenheit des Zytokins zur Abstoßung gebracht wurde (Grufman and Kärre, 2000). Auf der anderen Seite erschien die Abstoßung von peritoneal verabreichten RMA-S-Zellen als IL-12-unabhängig (Smyth et al., 1998). Letzterem entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit. *IL12p35^{-/-}p40^{-/-}*-Mäuse zeigten in hier betrachteten Modell keinerlei Einschränkung in ihrer Kompetenz, die intravenös applizierten *B2m^{-/-}*-Zellen suffizient abzustößen. Von einer essentiellen Rolle des IL-12 ist daher in diesem experimentellen System nicht auszugehen. Die für die Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen beobachtete Unabhängigkeit von Interleukin 12, bei gleichzeitiger Abhängigkeit von α -Interferonen, passt zu den Beobachtungen ihrer gegensätzlichen Regulierung in der Virusabwehr. So konnte gezeigt werden, dass die IFN- α -Sekretion von CD8⁺CD11b⁻-Dendritischen Zellen die Freisetzung von IL-12 durch CD8⁺CD11b⁺-Zellen supprimieren kann (Dalod et al., 2002).

Ob der Bahnungsmechanismus Natürlicher Killerzellen durch Dendritische Zellen mittels Typ-I-IFN-abhängigem oder mittels IL-12-abhängigem Mechanismus initiiert wird, erscheint daher insgesamt

stark vom auslösenden Stimulus abzuhängen (Jinushi et al., 2003a). Vergleichbar mit den Untersuchungen bezüglich einer Rolle der Typ-I-Interferone gilt auch für die aufgeführten Arbeiten zur IL-12-Beteiligung an der NK-Zell-Aktivierung, dass meist TLR-Stimuli als auslösende Reize verwendet wurden. Durch die in dieser Arbeit vorliegende Unabhängigkeit vom TLR-Signalweg unterscheiden sich die hier präsentierten Ergebnisse und geben neue Einblicke in die NK-Zell-Aktivierungskaskade nach Phagozytose apoptotischer Zellen.

Entsprechend der zusätzlichen Defizienz für die Interleukine 23 und 35 in *IL12p35^{-/-}p40^{-/-}*-Mäusen, können ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen, auch IL-23 und IL-35 als kritische Faktoren zur Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen ausgeschlossen werden. Dies entspricht Beobachtungen zur Reifung, Aktivierung und Funktion von humanen NK-Zellen, für die IL-23 als nicht essentiell angesehen wird (Feng et al., 2006; Guia et al., 2008). Im Gegenteil wurden sogar tumorfördernde Wirkungen durch IL-23 beschrieben (Xu et al., 2010). Darüberhinaus wird das Zytokin insbesondere in der Regulierung von CD8⁺-T-Zellen und weniger von Natürlichen Killerzellen gesehen, wenngleich eine aktivierende Wirkung auch auf letztere nachgewiesen werden konnte (Parham et al., 2002).

Aufgrund der erst kürzlich ermöglichten Differenzierung des IL-35 innerhalb der IL-12-Familie steht dessen Einordnung in die Abläufe und Zusammenhänge einer Infektions- oder Tumorzellabwehr noch am absoluten Anfang. Die wenigen Erkenntnisse über IL-35 deuten auf eine unabhängig von antigenpräsentierenden Zellen stattfindende Sekretion (durch Foxp3⁺ Treg-Zellen) sowie eine vorwiegend immunsuppressive Wirkung hin (Xu et al., 2010) und lassen die Beteiligung an den hier betrachteten NK-Zell-Mechanismen kongruent zu den erhobenen Ergebnissen als unwahrscheinlich erscheinen.

4.5 RMA-S-Lymphomzellen werden abhängig von Dendritischen Zellen aber unabhängig vom Typ-I-Interferonsystem abgestoßen

RMA-S-Zellen zeigen ebenso wie *B2m^{-/-}*-Zellen eine ausgeprägte Defizienz ihrer Klasse I MHC-Expression. Gemeinsam mit RMA-Zellen, aus denen sie hervorgegangen sind, bilden sie ein dem *B2m^{+/-}/ B2m^{-/-}*-Modell vergleichbares Paar zweier Zellvarianten, die sich nur im Ausmaß ihrer Klasse I MHC-Expression unterscheiden. Der Vergleich solcher ansonsten identischen Zellvarianten stellt eine wichtige Voraussetzung dar, um den Einfluss von „missing self“-Signalen und deren Bedeutung für die NK-Zell-abhängige Zellabstoßung separat von anderen Einflüssen untersuchen zu können. Kernpunkt dieser Arbeit ist die Definition kritischer Faktoren für NK-Zellen zur Erlangung optimaler Effektorkompetenz gegenüber solchen Zellen mit „missing self“-Signal. Neben *B2m^{-/-}*-Zellen eignen sich daher auch RMA-S-Zellen für entsprechende Untersuchungen. Zu berücksichtigen bleibt jedoch, dass es sich um Tumorzellen handelt, deren genaues Profil an zusätzlichen aktivierenden NK-Zell-Liganden

nicht vollständig beurteilbar ist, sodass die Initiierung der NK-Zell-vermittelten Zellyse nicht allein auf das Merkmal einer fehlenden Klasse I MHC-Expression bzw. NK-Zell-Inhibition reduzierbar ist. Vergleichbar mit *B2m*^{-/-}-Zellen ist aber ihre Neigung zur Apoptose nach Transfer in Akzeptormäuse, d.h. die Möglichkeit durch Phagozytose von Dendritischen Zellen aufgenommen zu werden und diese unter Umständen zu stimulieren. So wurden analoge Untersuchungen auch mit RMA-S-Zellen durchgeführt, da sie einer Bestätigung der anhand von *B2m*^{-/-}-Zellen ausgearbeiteten und dargestellten Ergebnisse dienen können.

NK-Zellen sind, vergleichbar der Situation mit *B2m*^{-/-}-Zellen, *in vitro* nicht in der Lage, RMA-S-Zellen effizient abzustößen bzw. durch sie zur IFN- γ -Freisetzung stimuliert zu werden. Erst die vorherige *In-vivo*-Stimulation mit poly(I:C), einem Typ-I-Interferonliberator, ermöglicht eine ausreichende Zytotoxizität, um Targetzellen abzustößen bzw. die IFN- γ -Freisetzung zu steigern. Entsprechend kann auch für dieses experimentelle System eine Notwendigkeit vorausgehender Schritte *in vivo* zur Erlangung der vollständigen Effektorkompetenz von NK-Zellen postuliert werden. Mit dem Ziel, die *In-vivo*-Bedingungen der RMA-S-Abstoßung zu untersuchen, wurde das *B2m*^{-/-}-Abstoßungsmodell auf RMA-S-Zellen als Targetzellen übertragen. Bereits nach zwei Stunden zeigte sich in B6-Wildtypmäusen eine signifikante Reduktion injizierter RMA-S-Tumorzellen. Die Analyse aller durchgeführten Experimente bestätigte diese sehr schnelle Abstoßungskinetik, in der innerhalb von 24 Stunden eine nahezu vollständige Lyse der Targetzellen beobachtet werden konnte. Grundlegende *In-vitro*-Untersuchungen mit RMA-S-Zellen (Kärre et al., 1986) wie auch spätere *In-vivo*-Experimente (Oberget al., 2004) arbeiteten ebenfalls mit vergleichbaren Zeitfenstern. Dem Unterschied zur Abstoßungsgeschwindigkeit von *B2m*^{-/-}-Zellen liegt dabei wahrscheinlich eine Expression zusätzlich aktivierender Liganden auf den Tumorzellen zugrunde. RMA-S-Zellen können daher, in etwa vergleichbar mit den Concanavalin A-stimulierten *B2m*^{-/-} (ConA-Blasten), als aktivierte Zellen angesehen werden und bieten so ein erhöhtes Targetpotential (Oberget al., 2004). Insbesondere die Lunge stellte sich dabei als Hauptort der RMA-S-Absiedlung und somit Lokalisation der Abstoßungsreaktion dar. Erklärbar ist dies durch die intravenöse Injektion der Tumorzellen als Applikationstechnik. Das Lungenkapillarbett stellt dabei die erste Engstelle nach Injektion dar, sodass sich die relativ großen Tumorzellen insbesondere in diesem Organ absiedeln und nur ein kleinerer Teil den systemischen Kreislauf und somit Zugang zu den Kapillarbetten der Leber und Milz erreicht.

Analog der Ergebnisse mit *B2m*^{-/-}-Zellen zeigte sich auch in der Abstoßung von RMA-S-Zellen eine klare NK-Zell-Abhängigkeit, da sowohl nach Depletion der Natürlichen Killerzellen als auch durch Knockout ihres Effektormechanismus in *Prf1*^{-/-}-Mäusen keine optimale Lyse der Tumorzellen stattfinden konnte. Mäuse, die defizient für NKT-Zellen waren, zeigten dagegen keine Einschränkung ihrer Lysefunktion, was die Unabhängigkeit von NKT-Zellen unterstreicht.

Unter Depletion Dendritischer Zellen konnte eine klar verminderte Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber RMA-S-Zellen beobachtet werden. Das Maß der RMA-S-Abstoßung entsprach dabei der Abstoßung in NK-Zell-depletierten Mäusen. Auch im Zusammenhang der Tumorabwehr ist daher von einem entscheidenden Beitrag Dendritischer Zellen zur Bahnung der NK-Zell-Zytotoxizität auszugehen. Diese Beobachtungen bestätigen damit die im Rahmen der Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Zellen gewonnenen Ergebnisse und bekräftigen die Rolle Dendritischer Zellen für die Bahnung von NK-Funktionen gegenüber Klasse I MHC-defizienten Targetzellen.

In diesem Zusammenhang nicht geklärt werden kann, warum sich sowohl in der Gruppe der NK-depletierten als auch der DC-depletierten Mäuse eine Abstoßung der Targetzellen von bis zu 50% findet. Die Tatsache, dass nur RMA-S-Zellen, nicht aber die in Kontrollen ebenfalls CFSE^{high}-markierten RMA-Zellen, der Teilabstoßung unterliegen, deutet dabei auf einen Klasse I MHC-spezifischen Mechanismus hin. Zu beachten ist, dass vorausgehende Untersuchungen an DC-depletierten Mäusen gar eine komplette Abstoßung an Targetzellen zeigten. Inwieweit der beobachtete Verlust an Klasse I MHC-defizienten Zellen auf NK-Zell- und DC-unabhängigen Mechanismen oder einer methodischen Unschärfe beruht, bleibt offen für weitere Untersuchungen.

Entgegen den klaren Resultaten gegenüber *B2m*^{-/-}-Zellen konnte in der Abstoßung von RMA-S-Zellen keine Abhängigkeit vom Typ-I-Interferonsystem nachgewiesen werden. Die Ausschaltung des Typ-I-Interferonrezeptors scheint keinerlei Einfluss auf die Effektorfunktion Natürlicher Killerzellen zu haben. Vergleichbare Konstellationen mit beobachteter Unabhängigkeit von Typ-I-Interferonen zeigten dagegen oft eine kritische Rolle von Interleukin 12 (Xu et al., 2010). Nach mehrfachen Untersuchungen *in vivo* konnte für das Zytokin hier jedoch keine entscheidende Beteiligung nachgewiesen werden. Als eines der wichtigsten von NK-Zellen selbst produzierten Zytokine gilt das Interferon- γ (Vivier et al., 2008). Auch im Rahmen der Tumorzellabwehr konnte dessen zentrale Bedeutung bestätigt werden (Dighe et al., 1994). Weder durch Einsatz von *Ifng*^{-/-} noch von *Ifngr1*^{-/-}-Mäusen konnte aber im *In-vivo*-Modell eine Einschränkung gegenüber der regulären Zellabstoßung in B6-Wildtypmäusen erzeugt werden. Auch das Typ-II-Interferon erscheint aufgrund dieser Ergebnisse nicht essentiell für die betrachteten Aktivierungs- und Abstoßungsmechanismen zu sein. Darüber hinaus konnten keine Abhängigkeiten von den wichtigen Rezeptor- und Signalstrukturen TLR9 und TRIF nachgewiesen werden. Sie gelten als zentrale Strukturen in der Erkennung von Pathogenmustern bzw. des folgenden Signalweges (Beutler, 2009). Auch TNF wurde als einer der möglichen an der RMA-S-Abstoßung bzw. im NK-DC-Crosstalk beteiligten Faktoren identifiziert (Smyth et al., 1998; Xu et al., 2007). Die Überprüfung des TNF auf seine Bedeutung im hier angewendeten *In-vivo*-Modell ergab keine kritische Rolle. Bereits dargestellt wurde die Beteiligung von Makrophagen an Aktivierungsvorgängen für NK-Zellen (Mortier et al., 2009). Eine selektive Depletion von Makrophagen

mithilfe einer Clodronat-Injektion führte allerdings ebenfalls zu keiner signifikant reduzierten NK-Funktion.

Keiner der vorausgehend dargestellten Faktoren kann daher als essentiell für die Abstoßung von RMA-S-Zellen im verwendeten *In-vivo*-Modell angesehen werden. Welcher Mechanismus es trotz unterschiedlichster Eingriffe in das Aktivierungs- und Regulierungssystem der NK-Zellen ermöglicht eine zu B6-Wildtypmäusen vergleichbare NK-Funktion zu erreichen, bleibt ungeklärt.

4.6 Ausblick

Wahrscheinlich infolge Phagozytose apoptotischer Targetzellen werden Dendritische Zellen zur Reifung stimuliert und treten in Kontakt mit Natürlichen Killerzellen. Es folgen Schritte, in denen Dendritische Zellen und IFN- α jeweils kritische Aufgaben übernehmen, um NK-Zellen derart vorzubereiten, dass diese im weiteren Kontakt mit Targetzellen ihre vollständige Effektor-, d.h. in diesem Fall Lysekompetenz entfalten können. Unklar indes bleibt die genaue Eingliederung von Dendritischen Zellen und IFN- α in diesen Ablauf.

Ziel weiterer Untersuchungen muss es daher zunächst sein, das genaue Aktivierungspotential der hier verwendeten Klasse I MHC-defizienten Zellen auf Dendritische Zellen und die darauf folgende Reifungsantwort herauszuarbeiten. Darüber hinaus gilt es, die molekulare Grundlage der Regelkreise zwischen Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen zu entschlüsseln. Insbesondere sollte dabei in Analogie zum *Priming* nach Infektionsstimuli die Rolle von IL-15 bzw. des IL-15-Rezeptors geklärt werden. Bezüglich der Beteiligung von Typ-I-Interferonen muss, in Abgrenzung zu IFN- β , die kritische Rolle von IFN- α bestätigt werden sowie geklärt werden, welche Zellen dessen Hauptproduzenten sind und welche Zellen darauf reagieren bzw. angewiesen sind. Im Rahmen der Reifungstheorie Natürlicher Killerzellen könnte ein Profil an NK-Zell-Subpopulationen im zeitlichen Verlauf unter Bedingungen einer DC-Depletion erstellt werden und dazu beitragen, die Reifungsabhängigkeit von NK-Zellen genauer darzustellen. Weitere zu berücksichtigende Punkte sollten sein, Orte zu identifizieren, an denen ein solcher Crosstalk zwischen Dendritischen Zellen und Natürlichen Killerzellen stattfindet sowie der sichere Ausschluss einer möglichen Beteiligung von Makrophagen und NKT-Zellen, bezogen auf die Abläufe im Rahmen der Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Lymphozyten des angeborenen Immunsystems und wurden als erste Abwehrlinie gegen virusinfizierte Zellen, Tumorzellen und geschädigte oder gestresste Zellen identifiziert. Dabei wurde ursprünglich angenommen, dass NK-Zellen ihre Zielzellen nach Kontakt direkt, das heißt ohne von Signalen anderer Zellen abhängig zu sein, lysieren können. In den letzten Jahren wurde allerdings deutlich, dass naive NK-Zellen, die direkt und ohne vorherige Stimulation isoliert werden, nur eine sehr geringe Effektorfunktion aufweisen. Es wurde zunehmend deutlich, dass auch NK-Zellen, ähnlich wie die Lymphozyten des adaptiven Immunsystems, zur Erlangung ihrer vollständigen zytotoxischen Kompetenz vorausgehende, bahnende Stimuli benötigen. Erste Studien im Rahmen der Abwehr von Infektionen zeigten, dass ein enger „Crosstalk“ zwischen NK-Zellen und Dendritischen Zellen und die damit verbundene Zytokinfreisetzung einen wichtigen Beitrag zum *Priming* von NK-Zell-Funktionen leistet. Dies war ein nicht ganz unerwarteter Befund, da Dendritische Zellen über eine Vielzahl von Rezeptoren verfügen, die auf die immunologische Erkennung von mikrobiellen Bausteinen spezialisiert sind und zur Produktion von Zytokinen (Interleukin 12, Typ-I-Interferone) führen, die mit NK-Zell-Aktivierung in Zusammenhang gebracht wurden. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob und welche bahnenden Faktoren für die Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten Zellen („Selbst“-Zellen (Milzzellen) und Tumorzellen) benötigt werden.

Syngene Klasse I MHC-defiziente Zellen (*B2m*^{-/-}-Milzzellen und RMA-S-Tumorzellen) konnten von frisch isolierten, naiven NK-Zellen nicht erkannt werden. Dieselben Zellen werden aber *in vivo* NK-Zell-abhängig nach kurzer Zeit abgestoßen und konnten auch von *in vivo* oder *in vitro* voraktivierten NK-Zellen effizient lysiert werden. Diese Daten zeigten, dass NK-Zellen *in vivo* Signale empfangen, die eine direkte Erkennung von Klasse I MHC-defiziente Zellen ermöglichen. Wir haben getestet, ob ähnlich den NK-Zell-Antworten im Kontext von Infektionen auch die Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten Zellen die Gegenwart von Dendritischen Zellen obligat benötigt. Interessanterweise konnten weder Klasse I MHC-defiziente Milzzellen noch Klasse I MHC-defizienten Tumorzellen (RMA-S) von Mäusen abgestoßen werden, bei denen alle Dendritischen Zellen (CD11c DTR^{Tg} Mäuse) *in vivo* depletiert wurden. Diese Daten dokumentieren, dass NK-Zellen auch bei der Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten „Selbst“-Zellen und Tumorzellen auf vorausgehende Bahnungsprozesse durch Dendritische Zellen angewiesen sind. Um die Signale zu untersuchen, über die Dendritische Zellen das NK-Zell-*Priming* medieren, haben wir die Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten Zellen in Typ-I-Interferon-Rezeptor- und Interleukin 12-defizienten Mäusen untersucht. Die Abstoßung von *B2m*^{-/-}-Milzzellen war abhängig vom Typ-I-Interferonsystem, während die Abstoßung von RMA-S Tumorzellen auch in Abwesenheit der Typ-I-Interferon Signalleitung stattfand. Im Gegensatz dazu war die Abstoßung Klasse I MHC-defizienter Zellen (Milzzellen und Tumorzellen) jedoch unabhängig von der Anwesenheit der Zytokine Interleukin 12, 23 und 35.

Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten Mal, dass NK-Zellen auch für die Abstoßung von Klasse I MHC-defizienten „Selbst“-Zellen und Tumorzellen auf vorausgehende Bahnungsprozesse durch Dendritische Zellen angewiesen sind. Eine Schlüsselrolle in diesem engen Crosstalk zwischen NK-Zellen und Dendritischen Zellen nehmen dabei Typ-I-Interferone ein. Erst durch dieses komplexe Zusammenspiel können Natürliche Killerzellen ihre vollständige Effektorkompetenz gegenüber den Klasse I MHC-defizienter Zellen erlangen. Zukünftige Studien müssen zeigen, wie Dendritische Zellen Klasse I MHC-defiziente Zellen „wahrnehmen“ und wie diese Signale dann an NK-Zellen weitergegeben werden. Unsere Daten zeigen auch, dass die therapeutische Modulation der Aktivität Dendritischer Zellen ein interessantes Target für die NK-Zell-vermittelte Immuntherapie von Tumoren darstellen könnte.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. **Akazawa, T., Ebihara, T., Okuno, M., Okuda, Y., Shingai, M., Tsujimura, K., Takahashi, T., Ikawa, M., Okabe, M., Inoue, N., et al.** (2007). Antitumor NK activation induced by the Toll-like receptor 3-TICAM-1 (TRIF) pathway in myeloid dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 252-257.
2. **Amakata, Y., Fujiyama, Y., Andoh, A., Hodohara, K., and Bamba, T.** (2001). Mechanism of NK cell activation induced by coculture with dendritic cells derived from peripheral blood monocytes. *Clin. Exp. Immunol* *124*, 214-222.
3. **Andoniou, C. E., van Dommelen, S. L. H., Voigt, V., Andrews, D. M., Brizard, G., Asselin-Paturel, C., Delale, T., Stacey, K. J., Trinchieri, G., and Degli-Esposti, M. A.** (2005). Interaction between conventional dendritic cells and natural killer cells is integral to the activation of effective antiviral immunity. *Nat. Immunol* *6*, 1011-1019.
4. **Andrews, D. M., Scalzo, A. A., Yokoyama, W. M., Smyth, M. J., and Degli-Esposti, M. A.** (2003). Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection. *Nat. Immunol* *4*, 175-181.
5. **Aneón, I., Cuturi, M. C., Trinchieri, G., and Perussia, B.** (1988). Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J. Exp. Med* *167*, 452-472.
6. **Banchereau, J., and Steinman, R. M.** (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* *392*, 245-252.
7. **Belardelli, F., Gessani, S., Proietti, E., Locardi, C., Borghi, P., Watanabe, Y., Kawade, Y., and Gresser, I.** (1987). Studies on the expression of spontaneous and induced interferons in mouse peritoneal macrophages by means of monoclonal antibodies to mouse interferons. *J. Gen. Virol* *68 (Pt 8)*, 2203-2212.
8. **Berzofsky, J. A., and Terabe, M.** (2008). NKT cells in tumor immunity: opposing subsets define a new immunoregulatory axis. *J. Immunol* *180*, 3627-3635.
9. **Beutler, B. A.** (2009). TLRs and innate immunity. *Blood* *113*, 1399-1407.
10. **Bisset, L. R., Lung, T. L., Kaelin, M., Ludwig, E., and Dubs, R. W.** (2004). Reference values for peripheral blood lymphocyte phenotypes applicable to the healthy adult population in Switzerland. *Eur. J. Haematol* *72*, 203-212.
11. **Bix, M., Liao, N. S., Zijlstra, M., Loring, J., Jaenisch, R., and Raulet, D.** (1991). Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice. *Nature* *349*, 329-331.
12. **Borg, C., Jalil, A., Laderach, D., Maruyama, K., Wakasugi, H., Charrier, S., Ryffel, B., Cambi, A., Figdor, C., Vainchenker, W., et al.** (2004). NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* *104*, 3267-3275.
13. **van den Broeke, L. T., Daschbach, E., Thomas, E. K., Andringa, G., and Berzofsky, J. A.** (2003). Dendritic cell-induced activation of adaptive and innate antitumor immunity. *J. Immunol* *171*, 5842-5852.

14. **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*, 159-166.
15. **Burnet, M.** (1957). Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *Br Med J* *1*, 779-786.
16. **Carayannopoulos, L. N., Naidenko, O. V., Fremont, D. H., and Yokoyama, W. M.** (2002). Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J. Immunol* *169*, 4079-4083.
17. **Cerwenka, A., and Lanier, L. L.** (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol* *1*, 41-49.
18. **Cerwenka, A., Bakker, A. B. H., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J. H., and Lanier, L. L.** (2000). Retinoic Acid Early Inducible Genes Define a Ligand Family for the Activating NKG2D Receptor in Mice. *Immunity* *12*, 721-727.
19. **Chang, Z. L., Whiteside, T. L., and Herberman, R. B.** (1990). Immunoregulatory role of in vitro differentiated macrophages on human natural killer (NK)-cell activity. *Cell. Immunol* *125*, 183-196.
20. **Chiossone, L., Chaix, J., Fuseri, N., Roth, C., Vivier, E., and Walzer, T.** (2009). Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood* *113*, 5488-5496.
21. **Clement, M. V., Haddad, P., Soulie, A., Guillet, J., and Sasportes, M.** (1990). Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Nouv Rev Fr Hematol* *32*, 349-352.
22. **Collison, L. W., and Vignali, D. A. A.** (2008). Interleukin-35: odd one out or part of the family? *Immunol. Rev* *226*, 248-262.
23. **Collison, L. W., Workman, C. J., Kuo, T. T., Boyd, K., Wang, Y., Vignali, K. M., Cross, R., Sehy, D., Blumberg, R. S., and Vignali, D. A. A.** (2007). The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* *450*, 566-569.
24. **Cooley, S., and Weisdorf, D. S.** (2010). Natural killer cells and tumor control. *Curr. Opin. Hematol* *17*, 514-521.
25. **Cui, J., Shin, T., Kawano, T., Sato, H., Kondo, E., Toura, I., Kaneko, Y., Koseki, H., Kanno, M., and Taniguchi, M.** (1997). Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. *Science* *278*, 1623-1626.
26. **Dalod, M., Hamilton, T., Salomon, R., Salazar-Mather, T. P., Henry, S. C., Hamilton, J. D., and Biron, C. A.** (2003). Dendritic cell responses to early murine cytomegalovirus infection: subset functional specialization and differential regulation by interferon alpha/beta. *J. Exp. Med* *197*, 885-898.
27. **Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Brière, F., Trinchieri, G., and Biron, C. A.** (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J. Exp. Med* *195*, 517-528.
28. **Dalton, D. K., Pitts-Meek, S., Keshav, S., Figari, I. S., Bradley, A., and Stewart, T. A.** (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* *259*, 1739-1742.

29. **Decker, T., Müller, M., and Stockinger, S.** (2005). The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat. Rev. Immunol* 5, 675-687.
30. **Degli-Esposti, M. A., and Smyth, M. J.** (2005). Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat. Rev. Immunol* 5, 112-124.
31. **Della Chiesa, M., Vitale, M., Carlomagno, S., Ferlazzo, G., Moretta, L., and Moretta, A.** (2003). The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *Eur. J. Immunol* 33, 1657-1666.
32. **Diefenbach, A., and Raulet, D. H.** (2001). Strategies for target cell recognition by natural killer cells. *Immunol. Rev* 181, 170-184.
33. **Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N., and Raulet, D. H.** (2000). Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat. Immunol* 1, 119-126.
34. **Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M., and Raulet, D. H.** (2001). Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413, 165-171.
35. **Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., and Schreiber, R. D.** (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447-456.
36. **Djeu, J. Y., Heinbaugh, J. A., Holden, H. T., and Herberman, R. B.** (1979). Augmentation of mouse natural killer cell activity by interferon and interferon inducers. *J. Immunol* 122, 175-181.
37. **Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D.** (2004a). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 137-148.
38. **Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D.** (2004b). The three Es of cancer immunoediting. *Annu. Rev. Immunol* 22, 329-360.
39. **Ehlers, S., Lehmann, J., Mossmann, H., Alber, G., and Hölcher, C.** (2005). Interleukin-12p40 mediates transient protection against *Mycobacterium avium* infection in the absence of interleukin-12. *Immunobiology* 210, 217-227.
40. **Ehrlich, P.** (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk.* 5, 273-290.
41. **Erlandsson, L., Blumenthal, R., Eloranta, M. L., Engel, H., Alm, G., Weiss, S., and Leanderson, T.** (1998). Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts. *Curr. Biol* 8, 223-226.
42. **Erten, G., Aktas, E., and Deniz, G.** (2008). Natural killer cells in allergic inflammation. *Chem Immunol Allergy* 94, 48-57.
43. **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, 798-811.
44. **Feng, C. G., Kaviratne, M., Rothfuchs, A. G., Cheever, A., Hieny, S., Young, H. A., Wynn, T. A., and Sher, A.** (2006). NK cell-derived IFN-gamma differentially regulates innate resistance

- and neutrophil response in T cell-deficient hosts infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol* 177, 7086-7093.
45. **Ferlazzo, G., Morandi, B., D'Agostino, A., Meazza, R., Melioli, G., Moretta, A., and Moretta, L.** (2003). The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur. J. Immunol* 33, 306-313.
 46. **Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L., and Münz, C.** (2004). Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101, 16606-16611.
 47. **Ferlazzo, G., Tsang, M. L., Moretta, L., Melioli, G., Steinman, R. M., and Münz, C.** (2002). Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the Nkp30 receptor by activated NK cells. *J. Exp. Med* 195, 343-351.
 48. **Fernandez, N. C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., and Zitvogel, L.** (1999). Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med* 5, 405-411.
 49. **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, 4416-4423.
 50. **Finn, O. J., Lieberman, M., and Kaplan, H. S.** (1978). H-2 antigen expression: Loss in vitro, restoration in vivo, and correlation with cell-mediated cytotoxicity in a mouse lymphoma cell line. *Immunogenetics* 7, 79-88.
 51. **Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P.** (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med* 5, 1249-1255.
 52. **Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E. J., and Raulet, D. H.** (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.
 53. **Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G.** (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med* 195, 327-333.
 54. **Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G., and Trinchieri, G.** (2005). The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions. *J. Immunol* 174, 727-734.
 55. **Gidlund, M., Orn, A., Wigzell, H., Senik, A., and Gresser, I.** (1978). Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 273, 759-761.
 56. **Gill, R. G.** (2010). NK cells: elusive participants in transplantation immunity and tolerance. *Curr. Opin. Immunol* 22, 649-654.
 57. **Granucci, F., Zanoni, I., Pavelka, N., Van Dommelen, S. L. H., Andoniou, C. E., Belardelli, F., Degli Esposti, M. A., and Ricciardi-Castagnoli, P.** (2004). A contribution of mouse dendritic cell-derived IL-2 for NK cell activation. *J. Exp. Med* 200, 287-295.
 58. **Grégoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E., and Walzer, T.** (2007). The trafficking of natural killer cells. *Immunol. Rev* 220, 169-182.

59. **Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T.** (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734-738.
60. **Grufman, P., and Kärre, K.** (2000). Innate and adaptive immunity to tumors: IL-12 is required for optimal responses. *Eur. J. Immunol* *30*, 1088-1093.
61. **Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. M., Greenberg, N. R., et al.** (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* *28*, 571-580.
62. **Guia, S., Cognet, C., de Beaucoudrey, L., Tessmer, M. S., Jouanguy, E., Berger, C., Filipe-Santos, O., Feinberg, J., Camcioglu, Y., Levy, J., et al.** (2008). A role for interleukin-12/23 in the maturation of human natural killer and CD56+ T cells in vivo. *Blood* *111*, 5008-5016.
63. **Haerberlein, S., Sebald, H., Bogdan, C., and Schleicher, U.** (2010). IL-18, but not IL-15, contributes to the IL-12-dependent induction of NK-cell effector functions by *Leishmania infantum* in vivo. *Eur. J. Immunol* *40*, 1708-1717.
64. **Hamby, K., Trexler, A., Pearson, T. C., Larsen, C. P., Rigby, M. R., and Kean, L. S.** (2007). NK cells rapidly reject allogeneic bone marrow in the spleen through a perforin- and Ly49D-dependent, but NKG2D-independent mechanism. *Am. J. Transplant* *7*, 1884-1896.
65. **Hanahan, D., and Weinberg, R. A.** (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* *100*, 57-70.
66. **Hanahan, D., and Weinberg, R. A.** (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646-674.
67. **Hayakawa, Y., and Smyth, M. J.** (2006). CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *J. Immunol* *176*, 1517-1524.
68. **Hayakawa, Y., Kelly, J. M., Westwood, J. A., Darcy, P. K., Diefenbach, A., Raulet, D., and Smyth, M. J.** (2002). Cutting edge: tumor rejection mediated by NKG2D receptor-ligand interaction is dependent upon perforin. *J. Immunol* *169*, 5377-5381.
69. **Hayakawa, Y., Watt, S. V., Takeda, K., and Smyth, M. J.** (2008). Distinct receptor repertoire formation in mouse NK cell subsets regulated by MHC class I expression. *J. Leukoc. Biol* *83*, 106-111.
70. **Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., Matsumoto, M., Hoshino, K., Wagner, H., Takeda, K., et al.** (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* *408*, 740-745.
71. **Herberman, R. B., Djeu, J. Y., Ortaldo, J. R., Holden, H. T., West, W. H., and Bonnard, G. D.** (1978). Role of interferon in augmentation of natural and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Treat Rep* *62*, 1893-1896.
72. **Hochweller, K., Striegler, J., Hämmerling, G. J., and Garbi, N.** (2008). A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *Eur. J. Immunol* *38*, 2776-2783.
73. **Höglund, P., Ohlén, C., Carbone, E., Franksson, L., Ljunggren, H. G., Latour, A., Koller, B., and Kärre, K.** (1991). Recognition of beta 2-microglobulin-negative (beta2m-) T-cell blasts by natural killer cells from normal but not from beta 2m- mice: nonresponsiveness controlled by beta 2m- bone marrow in chimeric mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *88*, 10332-10336.

74. **Huang, S., Hendriks, W., Althage, A., Hemmi, S., Bluethmann, H., Kamijo, R., Vilcek, J., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M.** (1993). Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science* *259*, 1742-1745.
75. **Hunter, C. A., Gabriel, K. E., Radzanowski, T., Neyer, L. E., and Remington, J. S.** (1997). Type I interferons enhance production of IFN-gamma by NK cells. *Immunol. Lett* *59*, 1-5.
76. **Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., and Nakachi, K.** (2000). Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* *356*, 1795-1799.
77. **Jamieson, A. M., Isnard, P., Dorfman, J. R., Coles, M. C., and Raulet, D. H.** (2004). Turnover and proliferation of NK cells in steady state and lymphopenic conditions. *J. Immunol* *172*, 864-870.
78. **Janeway, C.** (2008). *Janeway's immuno biology*. 7th ed. (New York: Garland Science).
79. **Janssen, E., Tabeta, K., Barnes, M. J., Rutschmann, S., McBride, S., Bahjat, K. S., Schoenberger, S. P., Theofilopoulos, A. N., Beutler, B., and Hoebe, K.** (2006). Efficient T cell activation via a Toll-Interleukin 1 Receptor-independent pathway. *Immunity* *24*, 787-799.
80. **Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y., and Hayashi, N.** (2003a). Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol* *170*, 1249-1256.
81. **Jinushi, M., Takehara, T., Tatsumi, T., Kanto, T., Groh, V., Spies, T., Suzuki, T., Miyagi, T., and Hayashi, N.** (2003b). Autocrine/paracrine IL-15 that is required for type I IFN-mediated dendritic cell expression of MHC class I-related chain A and B is impaired in hepatitis C virus infection. *J. Immunol* *171*, 5423-5429.
82. **Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Kärre, K., and Höglund, P.** (2005). Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules. *J. Exp. Med* *201*, 1145-1155.
83. **Joncker, N. T., Shifrin, N., Delebecque, F., and Raulet, D. H.** (2010). Mature natural killer cells reset their responsiveness when exposed to an altered MHC environment. *J. Exp. Med* *207*, 2065-2072.
84. **Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P., Sano, G.-I., De los Santos, K., Sparwasser, T., Wu, S., Vuthoori, S., Ko, K., Zavala, F., et al.** (2002). In vivo depletion of CD11c+ dendritic cells abrogates priming of CD8+ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* *17*, 211-220.
85. **Kägi, D., Ledermann, B., Bürki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H.** (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* *369*, 31-37.
86. **Kärre, K., Ljunggren, H. G., Piontek, G., and Kiessling, R.** (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* *319*, 675-678.
87. **Kasai, M., Iwamori, M., Nagai, Y., Okumura, K., and Tada, T.** (1980). A glycolipid on the surface of mouse natural killer cells. *Eur. J. Immunol* *10*, 175-180.

88. **Kassim, S. H., Rajasagi, N. K., Ritz, B. W., Pruett, S. B., Gardner, E. M., Chervenak, R., and Jennings, S. R.** (2009). Dendritic cells are required for optimal activation of natural killer functions following primary infection with herpes simplex virus type 1. *J. Virol* *83*, 3175-3186.
89. **Kawano, T., Cui, J., Koezuka, Y., Toura, I., Kaneko, Y., Sato, H., Kondo, E., Harada, M., Koseki, H., Nakayama, T., et al.** (1998). Natural killer-like nonspecific tumor cell lysis mediated by specific ligand-activated Valpha14 NKT cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *95*, 5690-5693.
90. **Kelly, J. M., Darcy, P. K., Markby, J. L., Godfrey, D. I., Takeda, K., Yagita, H., and Smyth, M. J.** (2002). Induction of tumor-specific T cell memory by NK cell-mediated tumor rejection. *Nat. Immunol* *3*, 83-90.
91. **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*, 112-117.
92. **Kim, R., Emi, M., and Tanabe, K.** (2007). Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* *121*, 1-14.
93. **Kim, S., Iizuka, K., Kang, H.-S. P., Dokun, A., French, A. R., Greco, S., and Yokoyama, W. M.** (2002). In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat. Immunol* *3*, 523-528.
94. **Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G.** (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J. Exp. Med* *170*, 827-845.
95. **Koller, B. H., Marrack, P., Kappler, J. W., and Smithies, O.** (1990). Normal development of mice deficient in beta 2M, MHC class I proteins, and CD8+ T cells. *Science* *248*, 1227-1230.
96. **Kondo, M., Weissman, I. L., and Akashi, K.** (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* *91*, 661-672.
97. **Körner, H., Cook, M., Riminton, D. S., Lemckert, F. A., Hoek, R. M., Ledermann, B., Köntgen, F., Fazekas de St Groth, B., and Sedgwick, J. D.** (1997). Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in organogenesis and spatial organization of lymphoid tissue. *Eur. J. Immunol* *27*, 2600-2609.
98. **Krug, A., French, A. R., Barchet, W., Fischer, J. A. A., Dzionek, A., Pingel, J. T., Orihuela, M. M., Akira, S., Yokoyama, W. M., and Colonna, M.** (2004). TLR9-dependent recognition of MCMV by IPC and DC generates coordinated cytokine responses that activate antiviral NK cell function. *Immunity* *21*, 107-119.
99. **Lanier, L. L., Phillips, J. H., Hackett, J., Tutt, M., and Kumar, V.** (1986). Natural killer cells: definition of a cell type rather than a function. *J. Immunol* *137*, 2735-2739.
100. **Lapaque, N., Walzer, T., Méresse, S., Vivier, E., and Trowsdale, J.** (2009). Interactions between human NK cells and macrophages in response to Salmonella infection. *J. Immunol* *182*, 4339-4348.
101. **Liao, N. S., Bix, M., Zijlstra, M., Jaenisch, R., and Raulet, D.** (1991). MHC class I deficiency: susceptibility to natural killer (NK) cells and impaired NK activity. *Science* *253*, 199-202.

102. **Lightner, A., Schust, D. J., Chen, Y.-B. A., and Barrier, B. F.** (2008). The fetal allograft revisited: does the study of an ancient invertebrate species shed light on the role of natural killer cells at the maternal-fetal interface? *Clin. Dev. Immunol* 2008, 631920.
103. **Ljunggren, H. G., and Kärre, K.** (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med* 162, 1745-1759.
104. **Ljunggren, H. G., and Kärre, K.** (1990). In search of the "missing self": MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237-244.
105. **Ljunggren, H. G., Ohlén, C., Höglund, P., Yamasaki, T., Klein, G., and Kärre, K.** (1988). Afferent and efferent cellular interactions in natural resistance directed against MHC class I deficient tumor grafts. *J. Immunol* 140, 671-678.
106. **Ljunggren, H.-G., and Malmberg, K.-J.** (2007). Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat. Rev. Immunol* 7, 329-339.
107. **Long, E. O.** (2007). Ready for prime time: NK cell priming by dendritic cells. *Immunity* 26, 385-387.
108. **Lucas, M., Schachterle, W., Oberle, K., Aichele, P., and Diefenbach, A.** (2007). Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26, 503-517.
109. **Madjd, Z., Spendlove, I., Pinder, S. E., Ellis, I. O., and Durrant, L. G.** (2005). Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int. J. Cancer* 117, 248-255.
110. **Magram, J., Connaughton, S. E., Warriar, R. R., Carvajal, D. M., Wu, C. Y., Ferrante, J., Stewart, C., Sarmiento, U., Faherty, D. A., and Gately, M. K.** (1996). IL-12-deficient mice are defective in IFN gamma production and type 1 cytokine responses. *Immunity* 4, 471-481.
111. **Martín-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, 1260-1265.
112. **Matzinger, P.** (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol* 12, 991-1045.
113. **Medzhitov, R., and Janeway, C. A.** (1997). Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* 91, 295-298.
114. **Mocikat, R., Braumüller, H., Gumy, A., Egeter, O., Ziegler, H., Reusch, U., Bubeck, A., Louis, J., Mailhammer, R., Riethmüller, G., et al.** (2003). Natural killer cells activated by MHC class I(low) targets prime dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses. *Immunity* 19, 561-569.
115. **Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P., and Tough, D. F.** (2002). Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* 99, 3263-3271.
116. **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, 668-675.
117. **Mortier, E., Advincula, R., Kim, L., Chmura, S., Barrera, J., Reizis, B., Malynn, B. A., and Ma, A.** (2009). Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha

- supports homeostasis of distinct CD8+ T cell subsets. *Immunity* 31, 811-822.
118. **Mosser, D. M., and Edwards, J. P.** (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol* 8, 958-969.
 119. **Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., and Aguet, M.** (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264, 1918-1921.
 120. **Nathenson, S. G., Uehara, H., Ewenstein, B. M., Kindt, T. J., and Coligan, J. E.** (1981). Primary structural: analysis of the transplantation antigens of the murine H-2 major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Biochem* 50, 1025-1052.
 121. **Oberg, L., Johansson, S., Michaëlsson, J., Tomasello, E., Vivier, E., Kärre, K., and Höglund, P.** (2004). Loss or mismatch of MHC class I is sufficient to trigger NK cell-mediated rejection of resting lymphocytes in vivo - role of KARAP/DAP12-dependent and -independent pathways. *Eur. J. Immunol* 34, 1646-1653.
 122. **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, 928-937.
 123. **Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., et al.** (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13, 715-725.
 124. **Orange, J. S., and Biron, C. A.** (1996). An absolute and restricted requirement for IL-12 in natural killer cell IFN-gamma production and antiviral defense. *Studies of natural killer and T cell responses in contrasting viral infections. J. Immunol* 156, 1138-1142.
 125. **Orange, J. S.** (2006). Human natural killer cell deficiencies. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 6, 399-409.
 126. **Osuga, Y., Koga, K., Hirota, Y., Hirata, T., Yoshino, O., and Taketani, Y.** (2011). Lymphocytes in endometriosis. *Am. J. Reprod. Immunol* 65, 1-10.
 127. **Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., et al.** (2002). A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol* 168, 5699-5708.
 128. **van Pesch, V., Lanaya, H., Renauld, J.-C., and Michiels, T.** (2004). Characterization of the murine alpha interferon gene family. *J. Virol* 78, 8219-8228.
 129. **Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N. M.** (2002). **Contact-dependent stimulation** and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J. Exp. Med* 195, 335-341.
 130. **Piontek, G. E., Taniguchi, K., Ljunggren, H. G., Grönberg, A., Kiessling, R., Klein, G., and Kärre, K.** (1985). YAC-1 MHC class I variants reveal an association between decreased NK sensitivity and increased H-2 expression after interferon treatment or in vivo passage. *J. Immunol* 135, 4281-4288.
 131. **Podack, E. R., Young, J. D., and Cohn, Z. A.** (1985). Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 82, 8629-8633.

132. **Probst, H. C., Tschannen, K., Odermatt, B., Schwendener, R., Zinkernagel, R. M., and Van Den Broek, M.** (2005). Histological analysis of CD11c-DTR/GFP mice after in vivo depletion of dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol* *141*, 398-404.
133. **Ramnath, N., Tan, D., Li, Q., Hylander, B. L., Bogner, P., Ryes, L., and Ferrone, S.** (2006). Is downregulation of MHC class I antigen expression in human non-small cell lung cancer associated with prolonged survival? *Cancer Immunol. Immunother* *55*, 891-899.
134. **Raulet, D. H.** (1994). MHC class I-deficient mice. *Adv. Immunol* *55*, 381-421.
135. **Reiman, J. M., Kmiecik, M., Manjili, M. H., and Knutson, K. L.** (2007). Tumor immunoediting and immunosculpting pathways to cancer progression. *Semin. Cancer Biol* *17*, 275-287.
136. **Robertson, M. J., Soiffer, R. J., Wolf, S. F., Manley, T. J., Donahue, C., Young, D., Herrmann, S. H., and Ritz, J.** (1992). Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF. *J. Exp. Med* *175*, 779-788.
137. **Van Rooijen, N., and Sanders, A.** (1994). Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J. Immunol. Methods* *174*, 83-93.
138. **Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A., and Kohno, K.** (2001). Diphtheria toxin receptor-mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice. *Nat. Biotechnol* *19*, 746-750.
139. **Sanos, S. L., Bui, V. L., Mortha, A., Oberle, K., Heners, C., Johner, C., and Diefenbach, A.** (2009). ROR γ and commensal microflora are required for the differentiation of mucosal interleukin 22-producing NKp46+ cells. *Nat. Immunol* *10*, 83-91.
140. **Santoli, D., Trinchieri, G., and Koprowski, H.** (1978). Cell-mediated cytotoxicity against virus-infected target cells in humans. II. Interferon induction and activation of natural killer cells. *J. Immunol* *121*, 532-538.
141. **Sauter, B., Albert, M. L., Francisco, L., Larsson, M., Somersan, S., and Bhardwaj, N.** (2000). Consequences of cell death: exposure to necrotic tumor cells, but not primary tissue cells or apoptotic cells, induces the maturation of immunostimulatory dendritic cells. *J. Exp. Med* *191*, 423-434.
142. **Schleicher, U., Liese, J., Knippertz, I., Kurzmann, C., Hesse, A., Heit, A., Fischer, J. A. A., Weiss, S., Kalinke, U., Kunz, S., et al.** (2007). NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. *J. Exp. Med* *204*, 893-906.
143. **Schleinitz, N., Vély, F., Harlé, J.-R., and Vivier, E.** (2010). Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology* *131*, 451-458.
144. **Seaman, W. E., Sleisenger, M., Eriksson, E., and Koo, G. C.** (1987). Depletion of natural killer cells in mice by monoclonal antibody to NK-1.1. Reduction in host defense against malignancy without loss of cellular or humoral immunity. *J. Immunol* *138*, 4539-4544.
145. **Semino, C., Angelini, G., Poggi, A., and Rubartelli, A.** (2005). NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1. *Blood* *106*, 609-616.

146. **Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D.** (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* *410*, 1107-1111.
147. **Shereck, E., Satwani, P., Morris, E., and Cairo, M. S.** (2007). Human natural killer cells in health and disease. *Pediatr Blood Cancer* *49*, 615-623.
148. **Slifka, M. K., Pagarigan, R. R., and Whitton, J. L.** (2000). NK markers are expressed on a high percentage of virus-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells. *J. Immunol* *164*, 2009-2015.
149. **Smyth, M. J., Kelly, J. M., Baxter, A. G., Körner, H., and Sedgwick, J. D.** (1998). An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J. Exp. Med* *188*, 1611-1619.
150. **Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I.** (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J. Exp. Med* *191*, 661-668.
151. **Statistisches Bundesamt Deutschland** (2009), GENESIS-Online. Available at: <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/logon>
152. **Steinman, R. M.** (2003). Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* *111*, 675-697.
153. **Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N. F., Chaput, N., and Zitvogel, L.** (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat. Immunol* *9*, 486-494.
154. **Trinchieri, G.** (1989). Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol* *47*, 187-376.
155. **Trinchieri, G., and Santoli, D.** (1978). Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells. Enhancement of human natural killer cell activity by interferon and antagonistic inhibition of susceptibility of target cells to lysis. *J. Exp. Med* *147*, 1314-1333.
156. **Vahlne, G., Becker, S., Brodin, P., and Johansson, M. H.** (2008). IFN- γ production and degranulation are differentially regulated in response to stimulation in murine natural killer cells. *Scand. J. Immunol* *67*, 1-11.
157. **del Val, M., Hengel, H., Häcker, H., Hartlaub, U., Ruppert, T., Lucin, P., and Koszinowski, U. H.** (1992). Cytomegalovirus prevents antigen presentation by blocking the transport of peptide-loaded major histocompatibility complex class I molecules into the medial-Golgi compartment. *J. Exp. Med* *176*, 729-738.
158. **Vivier, E., Nunès, J. A., and Vély, F.** (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* *306*, 1517-1519.
159. **Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T., and Ugolini, S.** (2008). Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol* *9*, 503-510.
160. **Walzer, T., Bléry, M., Chaix, J., Fuseri, N., Chasson, L., Robbins, S. H., Jaeger, S., André, P., Gauthier, L., Daniel, L., et al.** (2007a). Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* *104*, 3384-3389.
161. **Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L., and Vivier, E.** (2005). Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force." *Blood* *106*, 2252-2258.

162. **Walzer, T., Jaeger, S., Chaix, J., and Vivier, E.** (2007b). Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr. Opin. Immunol* *19*, 365-372.
163. **Wilczyński, J. R., and Duechler, M.** (2010). How do tumors actively escape from host immunosurveillance? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* *58*, 435-448.
164. **Xu, J., Chakrabarti, A. K., Tan, J. L., Ge, L., Gambotto, A., and Vujanovic, N. L.** (2007). Essential role of the TNF-TNFR2 cognate interaction in mouse dendritic cell-natural killer cell crosstalk. *Blood* *109*, 3333-3341.
165. **Xu, M., Mizoguchi, I., Morishima, N., Chiba, Y., Mizuguchi, J., and Yoshimoto, T.** (2010). Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin. Dev. Immunol* *2010*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20885915> [Accessed February 13, 2011].
166. **Yang, Y., Früh, K., Chambers, J., Waters, J. B., Wu, L., Spies, T., and Peterson, P. A.** (1992). Major histocompatibility complex (MHC)-encoded HAM2 is necessary for antigenic peptide loading onto class I MHC molecules. *J. Biol. Chem* *267*, 11669-11672.
167. **Yu, Y., Hagihara, M., Ando, K., Gansuud, B., Matsuzawa, H., Tsuchiya, T., Ueda, Y., Inoue, H., Hotta, T., and Kato, S.** (2001). Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell cytotoxicity by dendritic cells. *J. Immunol* *166*, 1590-1600.
168. **Zijlstra, M., Li, E., Sajjadi, F., Subramani, S., and Jaenisch, R.** (1989). Germ-line transmission of a disrupted beta 2-microglobulin gene produced by homologous recombination in embryonic stem cells. *Nature* *342*, 435-438.
169. **Zitvogel, L., Mayordomo, J. I., Tjandrawan, T., DeLeo, A. B., Clarke, M. R., Lotze, M. T., and Storkus, W. J.** (1996). Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines. *J. Exp. Med* *183*, 87-97.

7 LEBENSLAUF

Seite 82 enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

8 DANKSAGUNG

Einige Menschen haben bei der Durchführung meiner Doktorarbeit einen kleineren oder größeren Beitrag geleistet. Ohne diese Beiträge wäre das Gelingen bedeutend schwerer, wenn nicht unmöglich gewesen. Mein besonderer Dank gilt daher...

... Prof. Dr. Andreas Diefenbach für die Überlassung dieses spannenden Themas und die umfassende Betreuung meiner Arbeit. Die vielen hilfreichen Unterstützungen und anregenden Diskussionen haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mein Interesse für die Immunologie immer wieder bekräftigt.

... Prof. Dr. Marco Idzko für die freundliche Übernahme der Zweitbegutachtung meiner Dissertation.

... Karin Oberle für die exzellente und geduldige Einführung in die experimentellen Techniken, ihr Mitwirken bei den teilweise sehr umfangreichen Versuchsanordnungen und ihre unermüdliche Unterstützung in allen Belangen der Laborarbeit.

... der Arbeitsgruppe Diefenbach für die außerordentlich angenehme Atmosphäre im Labor und die vielen kleinen Hilfestellungen bei den Tücken und Sorgen des experimentellen Alltags. Die Zeit mit Euch in- und außerhalb des Labors hat mir immer sehr viel Spaß gemacht.

... meiner Familie, der diese Arbeit gewidmet ist. Von ihr habe ich stets den uneingeschränkten Rückhalt erfahren um meinen Weg sorgenfrei einschlagen und mich auf das Studium und Vorankommen dieser Arbeit konzentrieren zu können. Elfie Lißmann gilt zudem ein besonderer Dank für das fleißige und tapfere Korrekturlesen dieser Arbeit.