

**Aus der Kinderklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Christian P. Speer**

**Regulation von DNAM-1, CD96 und TIGIT durch IL-12 in Natürli-
chen Killer (NK-) Zellen**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andrej Shahnian

aus Hamburg

Würzburg, November 2019

Referent: apl. Prof. Dr. Matthias Wölfel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Beilhack

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Wolfgang Kastenmüller

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2021

Der Promovend ist Arzt

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Regulation von DNAM-1, CD96 und TIGIT durch IL-12 in Natürlichen Killer (NK-) Zellen" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hamburg, den 18.05.2021

A. Shahnian
.....

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Material.....	6
2.1.1 Reagenzien.....	6
2.1.2 Antikörper.....	7
2.1.3 Zelllinien.....	8
2.1.4 Interleukine.....	9
2.2 Methoden.....	9
2.2.1 Durchflusszytometrie: fluorescence-activated cell scanning (FACS).....	9
2.2.2 Zellkultur Techniken.....	10
2.2.3 NK-Zell Stimulation und Inkubation.....	15
2.2.4 IFN- γ /IL1- α Stimulation.....	15
2.2.5 Caspase Assay.....	15
3 Ergebnisse	17
3.1 Stimulation von NK-Zellen mit IL-12 für 48h.....	18
3.1.1 IL-12 steigert die Expression von DNAM-1 auf NK-Zellen.....	22
3.1.2 Expressionssteigerung von DNAM-1 in Abhängigkeit der Inkubationszeiten mit IL-12 25	
3.2 Stimulation von 7-Tagen kultivierten NK-Zellen mit IL-12 für 48h.....	27
3.2.1 IL-12 bewirkt eine Herabregulation von CD96.....	29
3.3 NK Subpopulationen: CD56 ^{dim} CD16 ⁺ und CD56 ^{bright} CD16 ⁻	30
3.3.1 Stimulation von CD56 ^{dim} CD16 ⁺ Zellen mit IL-12 für 48h.....	31
3.3.2 Stimulation von CD56 ^{bright} CD16 ⁻ Zellen mit IL-12 für 48h.....	33
3.4 Regulation von CD 112/CD 155 auf ES- und Melanom-Zelllinien durch IFN- γ und IL-1 α	35
3.4.1 IFN- γ steigert die Expression von CD112 und CD155 auf SK-ES-1 Zellen.....	35
3.5 Funktioneller Caspase Assay.....	37
3.5.1 Analyse der Zytotoxizität der NK-Zellen.....	39

4	Diskussion	42
4.1	IL-12 zeigt große Auswirkungen auf die Rezeptor-expressionen an der NK-Zelloberfläche	42
4.2	IFN- γ steigert die Expression der Liganden für DNAM-1 auf SK-ES-1-Zellen	44
4.3	IL-12 steigert nicht die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber SK-ES-1 und TC-71 Tumorzelllinien	45
4.4	Problem-Management in der Zellkultur und beim FACS	47
4.4.1	Aufreinigung und Kultivierung	47
4.5	Ausblick	49
4.5.1	Modulation der DNAM-1/TIGIT/CD96 - Achse.....	50
5	Zusammenfassung	52
6	Anhang	54
7	Literaturverzeichnis	59

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1: DIE ROLLE NEKTIN-ÄHNLICHER REZEPTOREN AUF NK-ZELLEN	4
ABB. 2: AUFREINIGUNG VON NK-ZELLEN UND DEREN SUBPOPULATIONEN AUS PBMC	15
ABB. 3: ZEITLICHER ABLAUF DER EXPERIMENTE	18
ABB. 4: IL-12 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON MEHREREN NK-REZEPTOREN	19
ABB. 5: STIMULATION VON NK-ZELLEN MIT IL-12 FÜR 48H. DARSTELLUNG DER EINZELNEN MESSPUNKTE	21
ABB. 6: STIMULATION VON NK-ZELLEN MIT IL-12 FÜR 48H	22
ABB. 7: IL-12 BEEINFLUSST DIE EXPRESSION VON CD 56 UND CD 16	24
ABB. 8: A. ZEITLICHER ABLAUF DER EXPERIMENTE. B. EXPRESSION DER REZEPTOREN DNAM-1, CD-96 UND TIGIT AUF NK-ZELLEN IM VERGLEICH VON 18H VS. 48H STIMULATIONSZEIT MIT IL-12	26
ABB. 9: ZEITLICHER ABLAUF DER EXPERIMENTE	27
ABB. 10: STIMULATION VON 7 TAGE ALTEN NK-ZELLEN	28
ABB. 11: NK-ZELL-SUBPOPULATIONEN	30
ABB. 12: ZEITLICHER ABLAUF DER EXPERIMENTE	31
ABB. 13: STIMULATION VON CD56 ^{DIM} CD16 ⁺ ZELLEN MIT IL-12	32
ABB. 14: STIMULATION VON CD56 ^{BRIGHT} CD16 ⁻ ZELLEN MIT IL-12	34
ABB. 15: IFN- γ STEIGERT DIE EXPRESSION VON CD112 UND CD155 AUF SK-ES-1 ZELLEN	36
ABB. 16: ZEITLICHER ABLAUF DER EXPERIMENTE	38
ABB. 17: IL-12 VERSTÄRKT NICHT DIE ZYTOTOXIZITÄT VON NK-ZELLEN	40
ABB. 18: AUFREINIGUNG VON NK-ZELLEN VOR DEM CASPASE-ASSAY	48

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: EINTEILUNG DER UNTERSUCHTEN NK-ZELL-REZEPTOREN	3
TABELLE 2: REAGENZIEN	6
TABELLE 3: ANTIKÖRPER	7
TABELLE 4: ZELLINIEN	8
TABELLE 5: INTERLEUKINE	9
TABELLE 6: EXPRESSION VON CD112 UND CD 155	54

Abkürzungsverzeichnis

Kürzel	Erklärung
ADCC	Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
mAK	Monoklonale Antikörper
DMSO	Dimethylsulfoxid
FACS	fluorescence-activated cell scanning/sorting
FSC	Forward-scatter
HS	Humanserum
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motifs
K _d	Dissoziationskonstante
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptor
MedFI	Median der Fluoreszenzintensität
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PBMCs	Peripheral blood mononuclear cells, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Lymphozyten, Monozyten, NK-Zellen)
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
SSC	Side-scatter

1 Einleitung

Unser Immunsystem erkennt und bekämpft nicht nur äußere Eindringlinge wie Bakterien, Pilze und Viren, sondern ist zusätzlich in der Lage, entartete, körpereigene Tumorzellen zu erkennen und gezielt abzutöten. Es besteht aus einem hochkomplexen Zusammenspiel mehrerer Zellreihen. Eine dieser Zellreihen stellen die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) dar, welche wir in dieser Arbeit näher untersucht haben.

1.1 NK-Zellen

NK-Zellen gehören neben den Antigen-präsentierenden Zellen (Makrophagen, dendritische Zellen) und den Granulozyten zu dem Teil des Immunsystems, welcher als angeborene Immunität bezeichnet wird. Die adaptive Immunität wird dagegen von T- und B-Zellen gebildet. Im Gegensatz zu den restlichen Zellen der angeborenen Immunität, welche aus myeloischen Vorläuferzellen entstehen, stammen die NK-Zellen ebenso wie T- und B-Zellen von lymphatischen Vorläuferzellen ab.

1.1.1 Funktion

NK-Zellen können die Immunantwort durch die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen einleiten, sind aber im Gegensatz zu T- und B-Zellen außerdem dazu in der Lage, entartete oder virusinfizierte Zellen ohne vorherige Sensibilisierung direkt abzutöten (daher ihr Name). Das Erkennen und die Elimination von entarteten Zellen (Tumorimmunität) erfolgt in einem komplexen Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen. So sind beispielsweise T- und B-Zellen in der Lage, Tumor-spezifische Antigene (TAA), welche als Folge von Mutation, Dysregulation und epigenetisch bedingten Veränderungen des Ursprungsgenoms entstehen, zu erkennen. Dadurch können sie den Tumor gezielt infiltrieren und bekämpfen. Tumore besitzen allerdings häufig Mechanismen, um ihre Antigenpräsentation z.B. auf MHC-I Molekülen zu unterdrücken. Die Unterdrückung der Expression von MHC-I Molekülen wird auch als „*missing self*“ bezeichnet und kann von NK-Zellen erkannt werden [1]. Diese leiten dann die Elimination der als fremd erkannten Zellen ein.

1.1.2 Untergruppen

Es können mehrere Untergruppen (Subpopulationen) von NK-Zellen unterschieden werden [2]. Die größte Gruppe bildet mit ca. 90% von im peripheren Blut befindlichen NK-Zellen die $CD56^{dim}CD16^+$ Population. Darauf folgt mit ca. 10% die Gruppe der $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$ Population (s. Abb. 11). Die größere $CD56^{dim}CD16^+$ Population besitzt eine höhere Zytotoxizität als die $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$ Population, bildet dafür allerdings weniger IFN- γ als die $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$ Population [2]. Des Weiteren unterscheiden sich die Populationen hinsichtlich ihrer Lokalisation im Körper. Während die $CD56^{dim}CD16^+$ NK-Zellen im peripheren Blut zirkulieren, sind $CD56^{bright}CD16^{dim/-}$ NK-Zellen eher im parafollikulären Gewebe von sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Tonsillen) zu finden [3]. Obwohl es vermehrt Hinweise in der Literatur gibt, dass die $CD56^{bright}$ Population eine Vorstufe in der Entwicklung zur „reifen“ $CD56^{dim}$ Population sei [4], ist es ebenfalls möglich, dass beide Populationen getrennt voneinander unterschiedliche Aufgaben in der Aktivierung des Immunsystems übernehmen [2, 5].

1.1.3 Rezeptoren

NK-Zellen verfügen über ein großes Arsenal von Rezeptoren, mit Hilfe dessen sie entartete oder als fremd identifizierte Zellen erkennen können und nehmen daher in der Bekämpfung von Tumoren eine wichtige Rolle ein.

In dieser Arbeit haben wir uns vor allem mit der Gruppe der Nektin-bindenden Rezeptoren beschäftigt. Dazu zählen unter anderem die Rezeptoren DNAM-1 (CD226) [6], TIGIT (WUCAM, VSTM3) [7, 8] und CD96 (TACTILE) [9]. Sie spielen eine wichtige Rolle für die lytischen Funktionen von NK-Zellen und T-Lymphozyten (T-Zellen). Mittels der Liganden CD155/PVR (Hauptligand, bindet alle drei Rezeptoren), CD112/PVRL2 (nur TIGIT und DNAM-1) und CD113 (nur TIGIT) ermöglichen sie es den Immunzellen, an Tumorzellen und gesunden Zellen zu binden [7, 10]. Die Rezeptoren konkurrieren hierbei um dieselben Liganden, erfüllen aber gegensätzliche Funktionen. Wenn DNAM-1 an CD155 bindet, führt dies zu einer aktivierenden Signalkaskade in der NK-Zelle, welche zum Absterben der gebundenen Zelle führt [11].

TIGIT dagegen wirkt inhibierend auf die NK-Zelle und verhindert die Apoptose der gebundenen Zelle [12]. Neben der Erkennung von MHC-I Molekülen auf körpereigenen Zellen durch die inhibierende Gruppe der KIR-Rezeptoren (killer cell immunoglobulin-like receptors) ist dies ein weiterer, wichtiger Signalweg der NK-Zellen, der sie zur Selbsttoleranz befähigt.

Die Rolle von CD96 blieb längere Zeit unklar, da CD96 zwar wie TIGIT eine intrazelluläre Domäne besitzt, welche auf eine inhibitorische Funktion schließen lassen (ITIM = immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs), es allerdings auch Studien gab, die für CD96 eine kostimulierende Funktion postulierten [13]. Christopher J. Chan *et al.* (2014) konnten einen großen Schritt zur Klärung der Funktion von CD96 beitragen, indem sie kürzlich im Mausmodell zeigten, dass CD96 als weiterer Gegenspieler zu DNAM-1 fungiert und negative Auswirkungen sowohl auf die Zytokinproduktion wie auch auf die Zytotoxizität von NK-Zellen besitzt [14].

Die Regulation über den gleichen Liganden erfolgt vermutlich über die unterschiedlichen Affinitäten zu den Liganden. So besitzt TIGIT die höchste Affinität zu CD155 (K_d 1-3 nM), gefolgt von CD96 (K_d 37,6 nM) und DNAM-1 (K_d 114-119 nM) [15].

Die Balance von DNAM-1 auf der einen und TIGIT bzw. CD96 auf der anderen Seite ist ein gutes Beispiel für die generelle Funktionsweise von NK-Zellen.

Man kann die Rezeptoren von NK-Zellen grob in zwei Gruppen unterteilen: aktivierende und inhibierende Rezeptoren. Zu den aktivierenden Rezeptoren, die wir in dieser Arbeit ebenfalls untersucht haben, gehören unter anderem CD16, CD314 (NKG2D) und die Mitglieder der Gruppe der Natural Cytotoxicity Receptors (NCR-Familie) mit NKp30, NKp36 und NKp44. Zusätzlich nahmen wir den Adhäsionsrezeptor CD62L und den inhibierenden Rezeptor CD161 in unsere Untersuchungen auf (s. Tabelle 1). Für eine ausführliche Auflistung und Kategorisierung der NK-Zell-Rezeptoren eignet sich die Arbeit von Vivier *et al.* (2011) [16].

Tabelle 1: Einteilung der untersuchten NK-Zell-Rezeptoren

Aktivierend	Inhibierend	Adhäsion
DNAM-1	TIGIT	DNAM-1
CD314/NKG2D	CD96 (?)	CD62L
CD16	CD161	CD56/NCAM
NKp30		
NKp36		

Tab. 1 Manche Rezeptoren wie DNAM-1 können in mehrere Kategorien eingeteilt werden, da sie sowohl als Adhäsionsrezeptor fungieren als auch die Aktivierungskaskade der NK-Zelle einleiten. Das (?) symbolisiert die noch nicht endgültig geklärte Funktion von CD96.

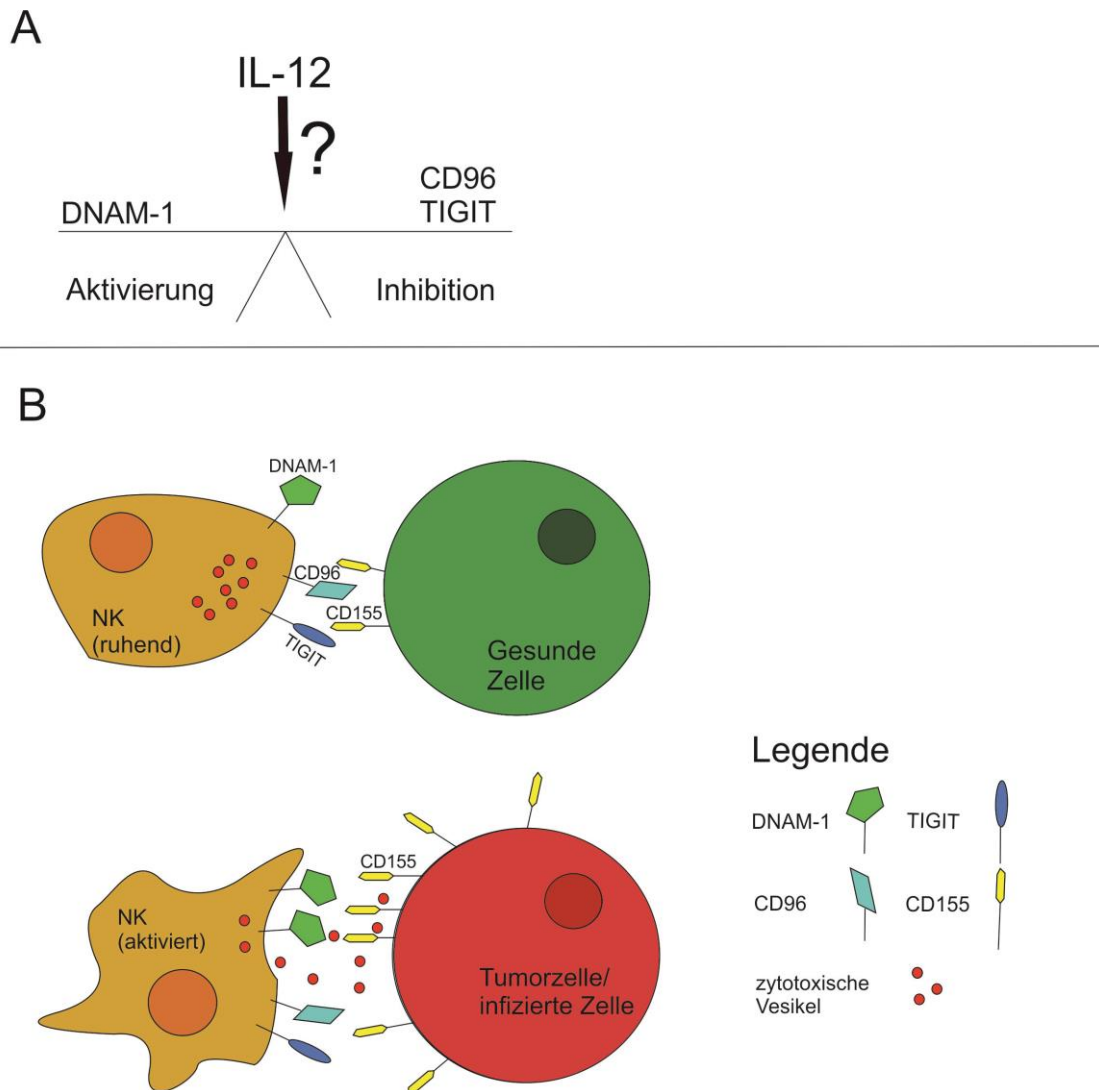


Abb. 1: Die Rolle Nektin-ähnlicher Rezeptoren auf NK-Zellen

A. Wie beeinflusst IL-12 das Gleichgewicht zwischen dem aktivierenden Rezeptor DNAM-1 und den inhibierend wirkenden Rezeptoren CD96 und TIGIT? **B.** Oben: Binden CD96/TIGIT an den Hauptliganden CD155 unterdrücken sie die Aktivität der NK-Zelle. Unten: einige Tumorarten exprimieren vermehrt CD155. Bindet DNAM-1 an CD155 wird die NK-Zelle aktiviert und schützt zytotoxische Vesikel und Zytokine aus, welche zur Perforation und zum Absterben der Tumorzelle führen. Abbildung modifiziert von Noa Stanietsky *et al.*(2010) [15].

Vereinfacht lässt sich zusammenfassen: Überwiegt der Einfluss von DNAM-1 oder anderer aktivierender Rezeptoren kommt es zur Ausschüttung zytotoxischer Granulas und zum Abtöten der gebundenen Zielzelle. Binden hingegen TIGIT oder andere inhibi-

torisch wirkende Rezeptoren (z.B. KIR-Rezeptoren), wird die Aktivität der NK-Zelle gehemmt (s. Abb. 1).

1.1.4 Modulation mittels IL-12

IL-12, erstmals NK-Zell stimulierender Faktor (NKSF) genannt, ist ein wichtiges Zytokin für die Aktivierung von NK- und T-Zellen, welches vor allem von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) produziert wird [17]. Es wirkt proinflammatorisch, indem es die Differenzierung und die Aktivierung von TH₁-Zellen fördert und TH₂-Zellen hemmt [18]. Zudem führt es zu einer gesteigerten Zytotoxizität und IFN- γ Produktion von NK-Zellen [18, 19]. Daher spielt es eine wichtige Rolle in der Regulation der angeborenen (natürlichen) sowie der adaptiven (erworbenen) Immunabwehr.

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich bei kultivierten reifenden T-Zellen zudem eine Verknüpfung von IL-12 und DNAM-1 nachweisen. IL-12 führt einerseits zu einer Sensibilisierung des T-Zell-Rezeptors (TCR) für eine Antigen-spezifische Aktivierung und erhöht damit die Aggressivität der T-Zellen gegenüber Tumoren. Andererseits führt IL-12 auch zu einer gesteigerten Zytotoxizität der T-Zellen, die unabhängig vom T-Zell-Rezeptor (TCR) ist. Dieser Effekt ist abhängig von DNAM-1 und das Signal wird über src-Kinasen weitergeleitet. Es handelt sich also um einen IL-12 vermittelten Signalweg, welcher gesteuert über den DNAM-1 Rezeptor und unabhängig vom TCR/HLA-System zur gesteigerten Tumorabwehr führt [20].

1.2 Zielsetzung

Inspiriert von den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe bei reifenden T-Zellen lag der Fokus dieser Arbeit darin herauszufinden, ob IL-12 auch bei NK-Zellen die Aktivität gegenüber Tumorzellen zu steigern vermag. Zudem wollten wir die Auswirkung von IL-12 auf die DNAM-1/TIGIT/CD96-Achse auf NK-Zellen untersuchen. Zusätzlich haben wir noch eine Reihe weiterer charakteristischer Rezeptoren von NK-Zellen in unsere Experimente aufgenommen und ihre Expressionsveränderung durch IL-12 gemessen (s. Tabelle 1). Des Weiteren wollten wir herausfinden, ob die beschriebenen NK-Subpopulationen unterschiedlich auf IL-12 reagieren.

Im funktionellen Caspase-Assay war es unser Ziel, neben den Auswirkungen von IL-12 auf die Aktivität von NK-Zellen ebenfalls die Bedeutung von DNAM-1 und CD96 für die Zytotoxizität der NK-Zellen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Tabelle 2: Reagenzien

Material	Hersteller
Biocoll	Biochrom Ag
Zellmedium CellGro	CellGenix
RPMI 1640 Medium (1x)	Biochrom AG
DMEM Medium	Gibco Life Tech
Humanserum	Biochrom AG
Penicillin/Streptomycin	PAA
FCS	Gibco Life Tech
DMSO	Sigma
PBS	Gibco Life Tech
NK cell isolation kit	MiltenyiBiotec
MACS Separation Columns (Größe LD/LS)	MiltenyiBiotec
CD56 ⁺ CD16 ⁻ Zellen isolation kit	MiltenyiBiotec
CD56 ⁺ CD16 ⁺ Zellen isolation kit	MiltenyiBiotec
OneComp eBeads	eBioscience
Accutase	Ge Healthcare (PAA Lab.)
Fixation Buffer	BioLegend

Intracell. Staining Perm/Wash (10x)	BioLegend
Trypanblau	Life Technologies

2.1.2 Antikörper

Tabelle 3: Antikörper

Antigen	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
CD3	eFluor 450	OKT3	eBioscience	1 : 50
CD3	APC eFluor 780	SK7	eBioscience	1 : 50
CD16	BV421	3G8	BD Biosciences	1 : 50
CD45	Pac.Blue	H130	eBioscience	1 : 50
CD56	APC	CMSSB	Miltenyi/eBioscience	1 : 50
CD56	PerCP/Cy5.5	HCD56	eBioscience	1 : 50
CD62L	APC eFluor780	DREG-56	eBioscience	1 : 50
CD96	PE	NK92.39	eBioscience	1 : 50
CD112	PE	TX31	BioLegend	1 : 50
CD155	PE	SKII.4	BioLegend	1 : 50
CD161	FITC	HP-3G10	BioLegend	1 : 50
TIGIT	PE	MBSA 43	eBioscience	1 : 50
TIGIT	PerCp eFluor710	MBSA 43	eBioscience	1 : 50
CD226 (DNAM-1)	FITC	TX25	BioLegend	1 : 50
CD314(NKG2D)	PerCP eFluor710	1D11	eBioscience	1 : 50
CD 335 (NKp46)	FITC	9E2	BioLegend	1 : 50
CD 336 (NKp44)	PerCP eFluor710	44.189	eBioscience	1 : 50
CD337 (NKp30)	PE	AF29- 4D12	eBioscience	1 : 50

Caspase 3 (rabbit)	PE	C92-605	BD Biosciences	1 : 25
DNAM-1		DX11	BD Biosciences	1 : 50
CD96		NK92.39	BioLegend	1 : 100
Mouse IgG k Isotype	PE		BD Biosciences	1 : 50
Control				

2.1.3 Zelllinien

Tabelle 4: Zelllinien

Name	Gewebe	Herkunft	HLA	Kulturmedium + 10%FCS + P/S
FM55	Melanom	Dr. Becker (Universität Würzburg)	A2+	RPMI
T6217	Glioblastom	Prof. S. Samnick, Nuklearmedizin	A2+	DMEM
SK-ES-1	Ewing-Sarkom	Dr. C. Rössig (Universität Münster)	A2+	RPMI
SK-N-MC	Ewing-Sarkom	Dr. C. Rössig (Universität Münster)	A2+	RPMI
TC71	Ewing-Sarkom	DSMZ Braunschweig	A2+	RPMI
RD-ES	Ewing-Sarkom	Dr. K. Schilbach (Universität Tübingen)	A2+	RPMI

2.1.4 Interleukine

Tabelle 5: Interleukine

Interleukin	Konzentration	Hersteller
IL-2	50IU/ml	PeptoTech
IL-15	5ng/ml	PeptoTech
IL-12	10ng/ml	PeptoTech

2.2 Methoden

2.2.1 Durchflusszytometrie: fluorescence-activated cell scanning (FACS)

Alle durchflusszytometrischen Messungen wurden an einem FACS Canto II (BD) Gerät mithilfe der FACS Diva II Software durchgeführt (BD).

Im FACS können Zellen charakterisiert werden. Dabei können sowohl intrazelluläre Faktoren über Permeabilisierung der Zellmembranen sowie Oberflächenmarker mittels Fluorochrom-gekoppelter Antikörper detektiert und deren Fluoreszenz analysiert werden. Das initiale Gate wird durch den forward-scatter (FSC) und den side-scatter (SSC) definiert. Der FSC liefert Informationen über die Größe der Zellen, der SSC über die Granularität der Zellen (Abb. 2, Erste Reihe).

In den Experimenten wurden bis zu 6 Antikörper simultan verwendet. Um die Überlagerung der Farbspektren (Overlap) dabei so gering wie möglich zu halten, wurden die passenden Farben in einem virtuellen Panel (z.B. mit dem Spectrumviewer von BD) zusammengestellt und für jedes Experiment eine eigene Kompensation mittels eBeads (Bioscience) erstellt.

2.2.1.1 Vorbereiten der Proben für die Durchflusszytometrie

Die Zellen (adhärente Zellen werden vorher mit Accutase gelöst) wurden zunächst zentrifugiert (1700rpm, 20°C, 4min) und das Zellmedium wurde entfernt. Darauf folgte ein einmaliges Waschen mit Phosphat-gepufferter Salzlösung, welche mit Humanserum versetzt ist (PBS/HS). Anschließend wurden Sie für 15-20min im Dunkeln mit Antikörpern inkubiert. Nach erneutem Waschen, um freie Antikörper zu entfernen, erfolgte die Messung am BD FACSCanto II (BD Biosciences).

2.2.1.2 Auswertung

Die Auswertung der aufgezeichneten FACS-Daten erfolgte mithilfe des FlowJo-Programms (Treestar) und die statistische Auswertung (paired t-test; 95% Konfidenzintervall) durch die Software Graphpad Prism (GraphPad Software, Inc). Als Maß für die Expressionsstärke eines Rezeptors wurde dabei der Median der Fluoreszenzintensität (MedFI) ermittelt. Um die Veränderungen der Expression unter IL-12 Gabe (Interventionsgruppe) zu veranschaulichen, haben wir die Ergebnisse des MedFI auf die Kontrollgruppe normalisiert, d.h. der MedFI der Kontrollgruppe wurde mit dem Wert 1 festgesetzt. Die jeweiligen Expressionsänderungen in der Interventionsgruppe sind mit Mittelwert (Mean) + Standardabweichung (SD) dargestellt.

2.2.2 Zellkultur Techniken

Alle Arbeiten mit Immun- und Tumorzelllinien wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Laminarflow, HeraSafe, Heraeus) und die isolierten Zellen danach bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Hera cell 240, Heraeus).

2.2.2.1 Zentrifugation

Soweit nicht anders angegeben erfolgte die Zentrifugation (Rotanta 460 RS, Hettich Zentrifugen) standardmäßig bei 4°C mit 1700 RPM für 4min.

2.2.2.2 Ermittlung der Lebendzellzahl mittels Trypanblau-Färbung

Zellsuspensionen (ca. 10ml PBS / 100Mill. Zellen) wurden 1:10 mit Trypanblaulösung verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer mithilfe eines Mikroskops (Kolleg SHB45) ausgezählt. Der Farbstoff Trypanblau wird ausschließlich von Zellen mit fehlender Membranintegrität aufgenommen. Daher erscheinen tote Zellen blau, lebende Zellen hingegen ungefärbt. Standardmäßig werden die Zellen in einem Quadrant gezählt, bei sehr geringen Zellzahlen können auch alle vier Quadranten gezählt werden. Da das Volumen in einem Quadranten 0,1 μ l entspricht, ergibt sich die Formel:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{0,1 \mu\text{l}} \times 10 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times \mu\text{l Zellsuspension} =$$

Gesamt Zellzahl in der Suspension

Bei größerer Aussaat und Versuchsreihen wurde mit dem automatischen Zellzähler (Invitrogen Countess) gezählt. Dafür wurden die Zellsuspensionen 1:1 mit Trypanblau gefärbt.

2.2.2.3 Auftrennung von adhärennten und nicht-adhärennten Tumorzelllinien

Alle Tumorzelllinien wurden bei einer Konfluenz von ca. 90% abgeerntet. Dafür wurde das Medium von adhärennten Tumorzellen abgenommen und die Hälfte verworfen. Die andere Hälfte wurde für die spätere Reinkubation aufbewahrt. Nicht-adhärennte Tumorzellen wurden vorher abzentrifugiert. Nachdem das Medium entfernt wurde, wurden die adhärennten Zellen mit 2ml Accutase für 5min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2ml Medium wurde die Reaktion gestoppt und die Zellen durch leichtes Abklopfen von der Platte gelöst.

2.2.2.4 Auftauen und Einfrieren von PBMC/Tumorzelllinien

Die Zellen wurden zentrifugiert und im Verhältnis 1:1 mit CellGro Medium und Humanserum + 10% DMSO resuspendiert und zu je 1×10^8 Zellen/Vial (1,8ml) bei -20°C eingefroren. Am nächsten Tag erfolgte dann die Umsetzung der Zellen in den Stickstofftank bei -80°C.

Zum Auftauen wurden die Zellen in der Hand oder im Wasserbad erwärmt und möglichst zügig in 10ml PBS/1%HS überführt. Daraufhin wurden sie zentrifugiert und in angewärmtem Medium resuspendiert. Die Tumorzelllinien wurden zunächst in 50ml

Zellkultur-Flaschen (Cellstar) mit 10ml Medium pipettiert und bei 90% Konfluenz in 250ml Zellkultur-Flaschen mit 18ml Medium überführt.

2.2.2.5 PBMC Aufreinigung aus Vollblut

Als Ausgangszellmaterial dienten anonymisierte Leukozytenfilter aus der Thrombozytopenese der Universitätsklinik Würzburg. Die Aufreinigung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) erfolgt anhand eines Dichtegradienten mittels Biocoll. Zum Waschen wurde PBS mit 1% HS verwendet. Die Zellen wurden entweder direkt zur NK Zell Aufreinigung weiter verwendet oder zur späteren Anwendung eingefroren.

2.2.2.6 Ethikvotum

Das Ausgangszellmaterial wurde nach dem **Ethikvotum Nr. 04/09 vom 19.01.2009** von der Transfusionsmedizin anonymisiert bereitgestellt.

2.2.2.7 NK Zell Aufreinigung aus PBMC

Die Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des *NK Cell Isolation Kit* (Miltenyi) mittels MicroBeads. Es handelt sich hierbei um eine negative Selektion. Im ersten Schritt binden die Biotin-gekoppelte Antikörper an alle Immunzellen außer den NK-Zellen. Im nächsten Schritt binden dann die MicroBeads an die Biotin Antikörper. Die Suspension läuft anschließend durch eine Magnetsäule, an der die MicroBeads (und die damit verbundenen Zellen) haften bleiben. Die NK-Zellen können die Magnetsäule dagegen frei passieren und sollten sich daher in der aufgefangenen Suspension befinden. Die Wahl der Magnetsäule (MS- oder LS-Säule, s. Datasheet von Miltenyi) hängt von der totalen Zellzahl und der Anzahl gebundener Zellen ab.

Zur Überprüfung der Reinheit im FACS wurden die Oberflächenantigene CD56 und CD3 untersucht. NK-Zellen sind charakteristischerweise CD3- und CD56+ (mit unterschiedlicher Ausprägung). Die Reinheit lag durchschnittlich bei >90%.

2.2.2.8 Aufreinigung von NK Subpopulationen CD56^{dim} CD16⁺ und CD56^{bright} CD16⁻

Die Aufreinigung der NK Subpopulationen CD56^{dim} CD16⁺ und CD56^{bright} CD16⁻ erfolgte mit den gleichnamigen Isolations kits von MiltenyiBiotec. Die Aufreinigung erfolgte dabei jeweils in zwei Schritten:

Aufreinigung CD56^{dim} CD16⁺: Als Erstes führt man die Depletion aller anderen Immunzellen analog zur NK-Zell Aufreinigung (2.2.2.6) aus. Mit der gewonnenen Suspension erfolgt anschließend die positive Selektion der CD56^{dim} CD16⁺ Population anhand von CD16 Microbeads.

Aufreinigung CD56^{bright} CD16⁻: Im ersten Schritt erfolgt die Depletion aller Nicht-CD56^{bright} CD16⁻ Zellen (also auch der CD16⁺ NK-Zellen) mittels Magnetsäule. Mit der gewonnenen Suspension erfolgt anschließend (analog zu oben) die positive Selektion der CD56^{bright} CD16⁻ Population anhand von CD56 Microbeads.

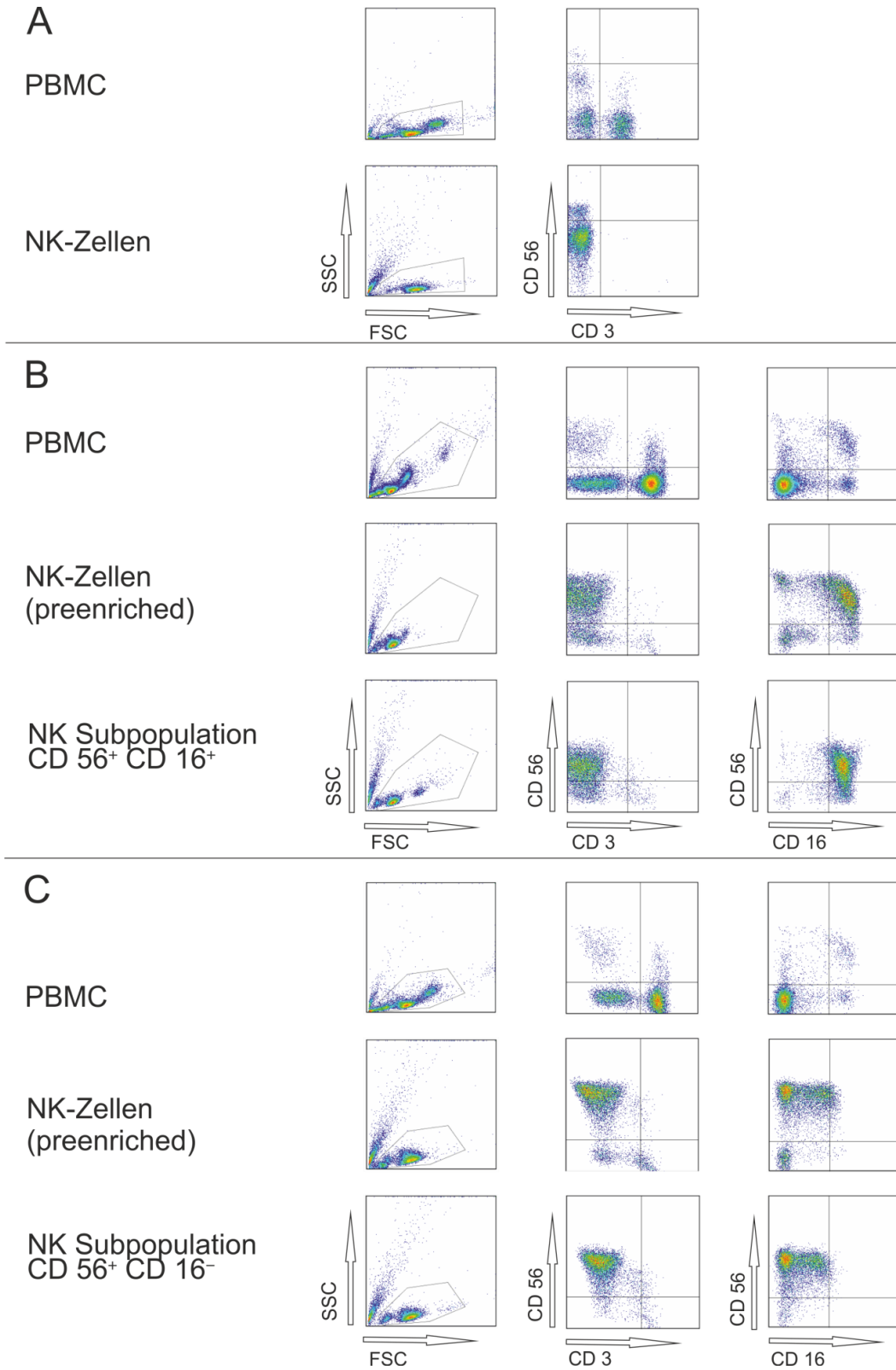


Abb. 2: Aufreinigung von NK-Zellen und deren Subpopulationen aus PBMC

A. Aufreinigung von Natürlichen Killer Zellen (NK-Zellen) aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Die waagerechte Linie trennt die CD56^{bright} von der CD56^{dim} Population. **B.** Aufreinigung von CD56^{dim} CD16⁺ Zellen aus PBMCs in 2 Schritten. **C.** Aufreinigung von CD56^{bright} CD16⁻ Zellen aus PBMCs in 2 Schritten. Die senkrechte Linie in B und C verdeutlicht die Trennung von CD16^{+/bright} und CD16^{-/dim} Zellen.

2.2.3 NK-Zell Stimulation und Inkubation

Die NK-Zellen wurden in 4 Gruppen (IL-2, IL-2 + IL-12, IL-15 und IL-15 + IL-12) geteilt und mit CellGro + 5% HS und 0,004% Penicillin/Streptomycin bei 37°C inkubiert. Die Gruppen wurden zusätzlich mit 50IU/ml IL-2 (PeproTech) oder 5ng/ml IL-15 (PeproTech) ± 10ng/ml IL-12 (PeproTech) behandelt. Die Zytokine wurden alle 2-3 Tage erneut hinzugegeben (Bei Stimulation über 7 Tage).

2.2.4 IFN-γ/IL1-α Stimulation

Die Tumorzelllinien wurden in einer 48-well Platte zu je 2×10^5 Zellen/well im entsprechenden Medium (DMEM/RPMI) ausgesät. Die Zellen wurden mit IFN-γ (100ng/ml) ± IL1-α (10ng/ml) für 48h bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte SK-ES-1 Zellen

Anschließend wurden die Zellen mit CD112/CD155 – PE gefärbt und am FACS gemessen. Es wurden zudem zusätzliche Isotype (PE) Kontrollen angefertigt.

2.2.5 Caspase Assay

Aufgereinigte NK-Zellen wurden nach obigem Schema (siehe 2.2.3) stimuliert und in eine 96well Platte zu je 50.000 bzw. 100.000 (je nach Ausbeute) ausgesät. Am Tag vor dem Assay wurden auch die Tumorzellen in einer 96well Platte ausgesät (E:T Verhältnis 1:1). Nach 48h wurde ein Teil der NK-Zellen mit blockierendem Antikörper gegen DNAM-1 (10µg/ml) bzw. CD96 (10µg/ml) für 1h bei 37° inkubiert. Der Versuch wurde mit verschiedenen Tumorzellreihen durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit PBS/1%HS gewaschen und die NK- Zellen (inklusive Zytokin/Antikörper-haltigem Medi-

um!) wurden auf die Tumorzellen überführt. Die Zellen wurden kurz (30s) abzentrifugiert und für 4h bei 37° inkubiert.

Die Zellen wurden mit CD56-PerCP und CD45-PB gefärbt (zur Unterscheidung von Tumorzellen und NK-Zellen im FACS) und anschließend mit Fix/Perm fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit Caspase-3-PE gefärbt und durchflußzytometrisch gemessen.

2.2.5.1 Gating Strategie

Wichtig für die sinnvolle Auswertung des Assays war es, das SSC-FSC Gate so zu setzen, dass nicht vitale Zellen und Zelltrümmer von Anfang an aus dem Gate ausgeschlossen wurden, da sie in den späteren Gates nicht mehr von den vitalen Tumorzellen unterschieden werden konnten (Abb. 17A, linke Reihe). Um eine spezifische Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber einem in Tumorzellpopulationen ungerichtet vorhandenen Zelluntergang zu unterscheiden, sollten nur lebende Zellen und sich gerade in der Apoptose befindende Zellen (Caspase-3⁺) gemessen werden. Nachdem die Gating Strategie dementsprechend angepasst wurde, konnten Spontanapoptose-Raten von <10% gemessen werden (Abb. 17A, rechte Reihe oben). Duplets von Tumorzellen (mehrere aneinander klebende Zellen) oder NK-Zellen, die noch an Tumorzellen gebunden sind („spitze Nase“, erkennbar in Abb. 17A, mittlere Reihe unten) wurden ebenfalls aus dem Gate entfernt, da wir nur die Apoptose Rate von einzelnen, vitalen Tumorzellen bestimmen wollten.

3 Ergebnisse

Der Fokus dieser Arbeit besteht in der Analyse des Einflusses von IL-12 auf die Rezeptoren DNAM-1 (CD226), CD96 und TIGIT auf NK-Zellen. DNAM-1 wird als Adhäsionsmolekül auf T- und NK-Zellen exprimiert [21] und trägt zudem zur NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegen eine Reihe von menschlichen Tumoren wie z.B. Ewing-Sarkome oder Melanomen bei [11, 22]. TIGIT und CD96 sind als Gegenspieler zu DNAM-1 beschrieben worden, indem sie um die gleichen Liganden (CD112/CD155) konkurrieren [14].

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits zeigen, dass IL-12 in CD8⁺ T-Zellen eine TCR/HLA-unabhängige Aktivierung und gesteigerte Zytotoxizität der Zellen bewirkt, welche über DNAM-1 gesteuert wird [20].

Wir stellten uns die Frage, ob IL-12 bei NK-Zellen ebenfalls die Zytotoxizität steigert und inwieweit IL-12 das Gleichgewicht von DNAM-1, CD96 und TIGIT beeinflusst.

Daher untersuchten wir zunächst die Auswirkungen von IL-12 auf ausgewählte Rezeptoren der NK-Zellen. Wir wählten 2 Zeitpunkte zur Stimulation aus (direkt nach der Aufreinigung und nach 7-tägiger Zellkultur mit IL-2/IL-15) und verglichen die Effekte. Wir untersuchten ebenfalls unterschiedlich lange Inkubationszeiten mit IL-12 und ihre Auswirkungen auf die Rezeptorexpression und Zytotoxizität der NK-Zellen. Anschließend untersuchten wir, ob es Unterschiede bei der Stimulation in den in der Literatur beschriebenen Subpopulationen von NK-Zellen [2] gibt. Abschließend untersuchten wir die Expression der Liganden von DNAM-1, CD96 und TIGIT auf den Tumorzellen (spätere target cells), bevor wir die Funktionalität von stimulierten vs. nicht-stimulierten NK-Zellen im Caspase Assay überprüften.

3.1 Stimulation von NK-Zellen mit IL-12 für 48h

Initial stimulierten wir NK-Zellen, indem wir sie für 48h mit IL-2/IL-15 \pm 10ng/ml IL-12 inkubierten. IL-12 ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches u.a. in der Aktivierung von T- und NK-Zellen eine wichtige Rolle spielt [17]. IL-2 und IL-15 sind ebenfalls Zytokine, welche für die Aktivierung von NK-Zellen benötigt werden [23]. Neben den oben erwähnten Rezeptoren DNAM-1, CD96 und TIGIT untersuchten wir dabei noch eine Reihe weiterer, charakteristischer Rezeptoren von NK-Zellen wie CD62L, NKG2D (CD314) und CD161. Als Marker für die Kennzeichnung der NK-Zell-Population dienten uns CD56, CD3 und CD16 [2]. Zur Veranschaulichung des Versuchsaufbaus dient der Zeitstrahl in Abb. 3.

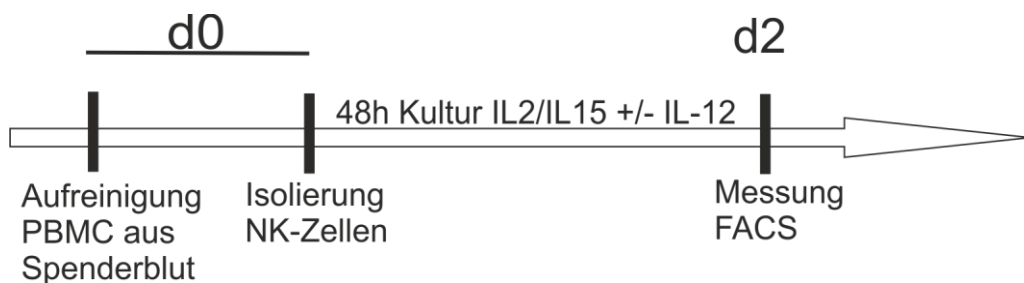


Abb. 3: Zeitlicher Ablauf der Experimente

Für eine genauere Beschreibung siehe Material u. Methoden Punkte 2.2.2.5-2.2.3.

In den ersten Versuchen zeigte sich bereits, dass IL-12 zu einer Steigerung der Expression von DNAM-1 auf den NK-Zellen führt (s. Abb. 4). Während IL-12 bei TIGIT und CD96 anscheinend keinen oder einen negativen Einfluss auf die Expression zeigt, ist bei CD 161 wiederum ein stark positiver Effekt zu erkennen. Um unsere Ergebnisse zu überprüfen, wiederholten wir die Experimente und nahmen weitere Rezeptoren zur Untersuchung auf (s. Abb. 5 u. 6).

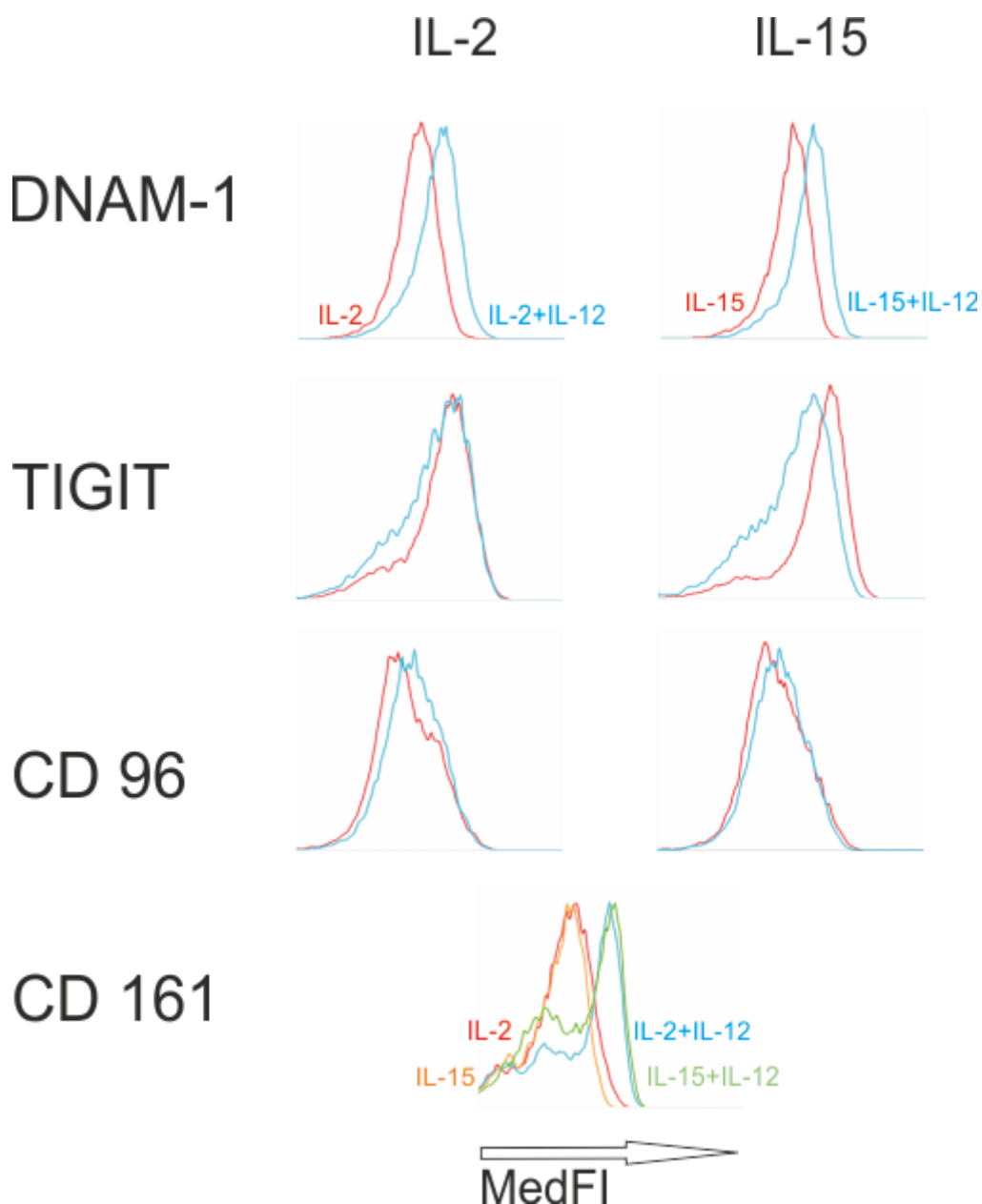


Abb. 4: IL-12 beeinflusst die Expression von mehreren NK-Rezeptoren

Dargestellt sind die Originalhistogramme (ermittelt durch das Flowjo-Programm) einzelner Versuche. Farbenlegende: rot: IL-2 bzw. IL-15, blau: IL-2 + IL-12 bzw. IL-15 + IL-12; unterste Zeile: rot: IL-2, orange: IL-15, blau: IL-2 + IL-12, grün: IL-15 + IL-12

Als Maß für die Expression wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MedFI) aus den einzelnen Histogrammen ermittelt. In Abb. 5 sind zunächst die einzelnen Messwerte dargestellt. Es ist erkennbar, dass es vereinzelt Experimente mit sehr hohen MedFI Werten gab. Die Veränderungen in der Expression der einzelnen Rezeptoren durch die Inkubation mit IL-12 sind dadurch aber nicht beeinflusst. Die Tendenzen sind in allen Experimenten ähnlich. Da unsere Fragestellung auf den Einfluss von IL-12 auf die Rezeptorenexpression abzielt, haben wir uns entschieden, unsere Messwerte im Folgenden auf die Kontrollgruppen IL-2 bzw. IL-15 zu normalisieren (diese = 1 zu setzen), um den Effekt von IL-12 zu veranschaulichen (s. Legende Abb. 6). Die niedrigeren p-Werte in Abb. 6 (vgl. DNAM-1 in Abb. 5 u. Abb. 6) sind durch die Normalisierung auf die Kontrollgruppe zu erklären, da hierdurch die unterschiedlich hohen MedFI-Werte angeglichen werden und die Standardabweichung abnimmt.

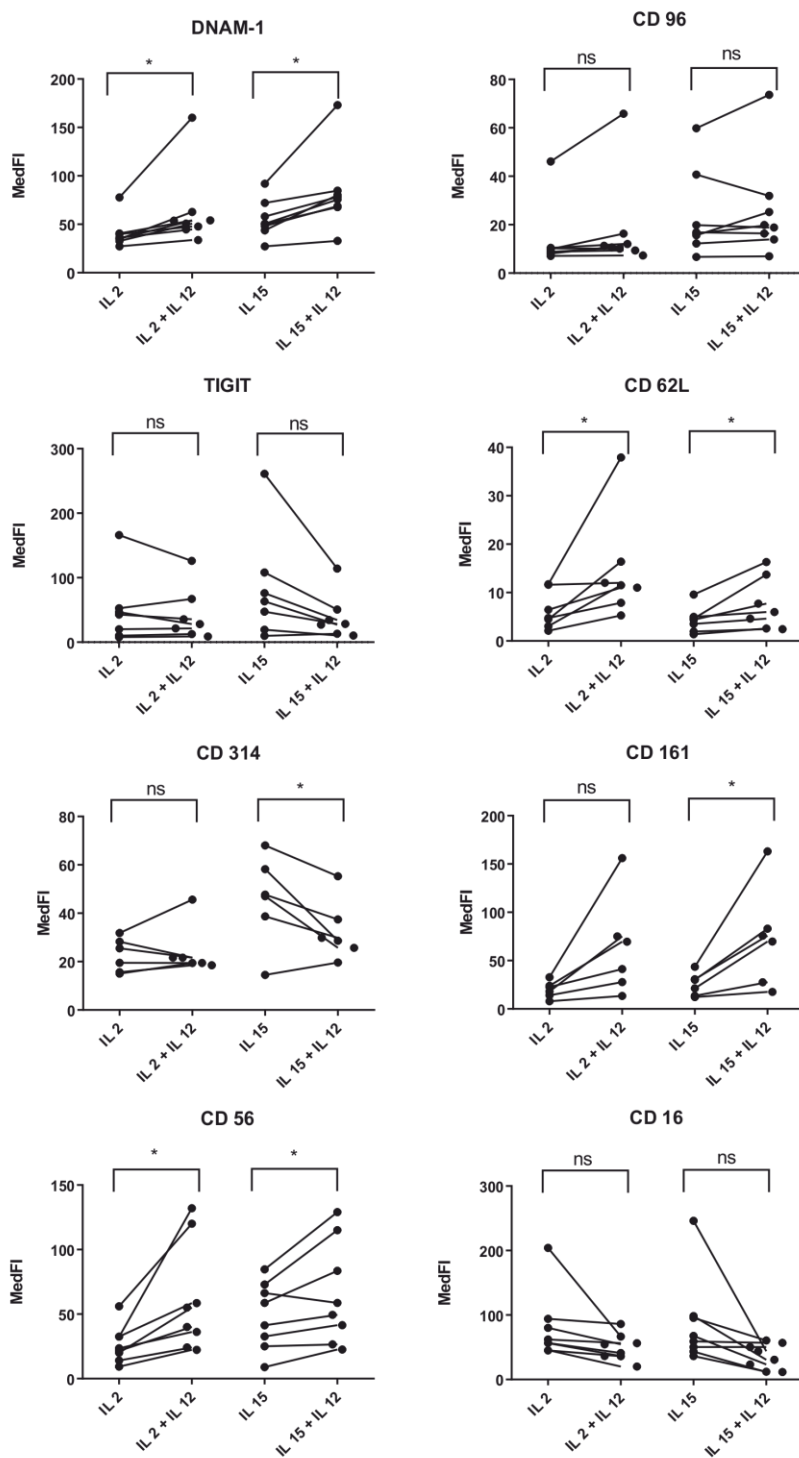


Abb. 5: Stimulation von NK-Zellen mit IL-12 für 48h. Darstellung der einzelnen Messpunkte

Ergebnisse zusammengefasst von ≥ 6 Experimenten. * $p < 0,05$; ns = nicht signifikant.

3.1.1 IL-12 steigert die Expression von DNAM-1 auf NK-Zellen

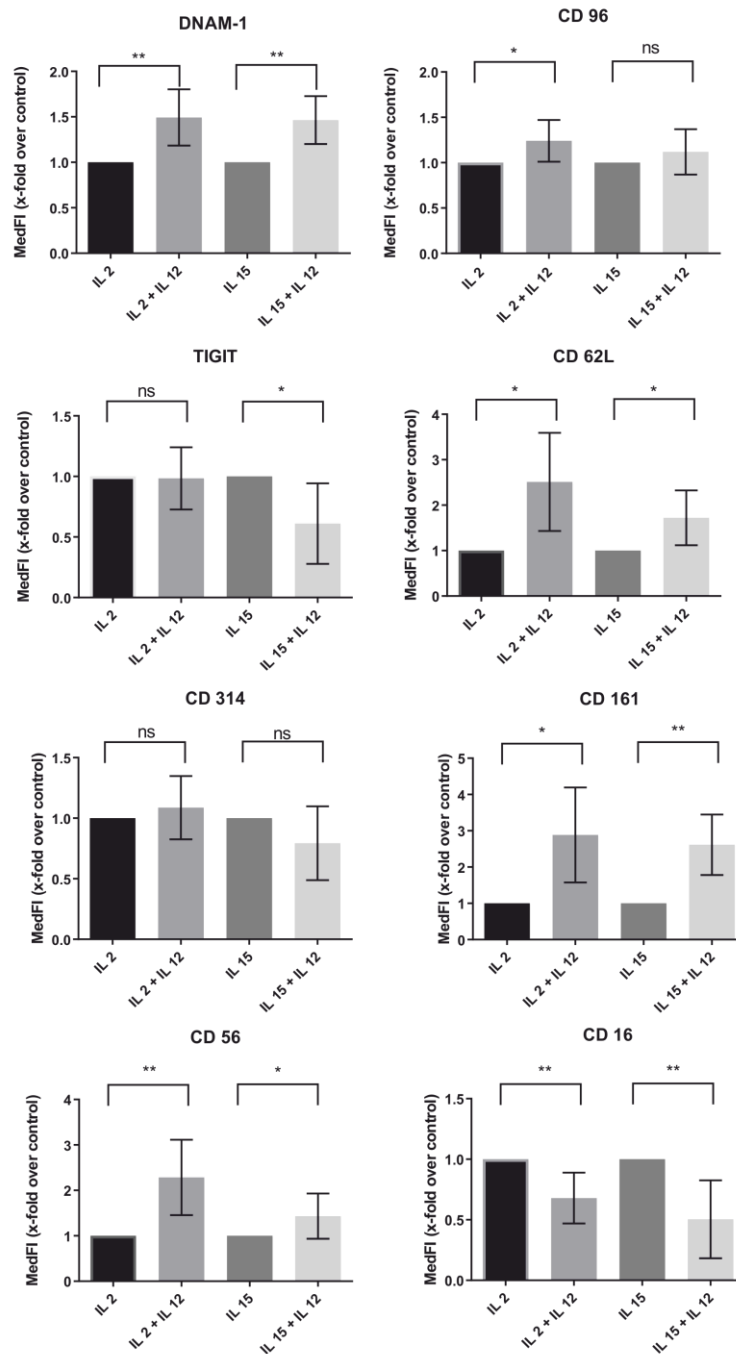


Abb. 6: Stimulation von NK-Zellen mit IL-12 für 48h

Nach der Aufreinigung von NK-Zellen aus PBMC wurden diese zu 5×10^5 - 1×10^6 Zellen/well in 4 Wells aufgeteilt und für 48h mit IL-2 (50IU/ml) oder IL-15 (5ng/ml) \pm IL-12 (10ng/ml) inkubiert. Die Kontrollgruppen wurden mit IL-2 bzw. IL-15 behandelt. Als Maß für die Expression wurde der Median der Fluoreszenzintensität (MedFI) ermittelt. Zur Veranschaulichung der Expressionsänderung haben wir die Ergebnisse auf die Kontrollgruppen normalisiert, daher gibt es keine SD bei diesen Balken! (Wert=1, jeweils 1. und 3. Balken, s. 2.2.1.2 Auswertung). Ergebnisse zusammengefasst von ≥ 6 Experimenten. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns = nicht signifikant

Nach Stimulation mit IL-12 für 48h zeigte sich eine statistisch signifikante Mehrexpression von DNAM-1 um das 1,5-fache (jeweils bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe IL-2/IL-15; Ergebnisse zusammengefasst aus 8 Experimenten, $p < 0,01$). Der Effekt war gleich stark ausgeprägt bei den IL-2 und IL-15 Gruppen. Auch die Expression von CD96 steigt unter IL-12 an, allerdings ist der Anstieg nur in der IL-2 Gruppe signifikant (Ergebnisse aus 8 Experimenten, $p < 0,05$) und insgesamt schwächer als bei DNAM-1. TIGIT dagegen weist keine Veränderung in der IL-2 Gruppe auf, in der IL-15 Gruppe bewirkt die Zugabe von IL-12 eine Herabregulation des Rezeptors (Ergebnisse aus 7 Experimenten, $p < 0,05$).

Der Rezeptor CD62L, ein Adhäsionsrezeptor, welcher NK- und T-Zellen den Übertritt in sekundäre lymphatische Organe durch hochendotheliale Venolen ermöglicht, eine sogenannte Leukodiapedese, ist als Marker für eine spezifische Subpopulation von CD56^{dim} NK-Zellen beschrieben worden [24]. Die Stimulation mit IL-12 bewirkt hierbei eine Steigerung der Expression um mehr als das 2-fache in der IL-2 Gruppe ($p < 0,05$). In der IL-15 Gruppe bleibt der Anstieg der Expression knapp unter dem 2-fachen.

Der Rezeptor NKG2D (CD314) gehört zu der Familie der C-Typ lectin-ähnlichen Rezeptoren und ist als aktivierender Rezeptor auf allen NK-Zellen exprimiert. Er erkennt veränderte Eigenproteine („*self-proteins*“), die auf der Oberfläche von gestressten, maligne veränderten oder infektiösen Zellen zu finden sind [25]. Er spielt bei der Detektion und Elimination dieser Zellen eine wichtige Rolle.

Wir konnten keinen statistisch signifikanten Einfluss von IL-12 auf die Expression von CD314 feststellen. Allerdings gibt es in der IL-15 Gruppe eine abfallende Tendenz der Expressionsrate unter IL-12.

CD161, ein Rezeptor auf NK-Zellen, der ebenfalls zur C-Typ lectin-ähnlichen Rezeptorfamilie gehört, wirkt inhibierend auf die Zytotoxizitätsrate und IFN- γ Produktion von NK-Zellen [26, 27]. Interessanterweise bewirkte die Stimulation mit IL-12 den größten gemessen Einfluss auf die Expressionsrate. Diese stieg um das bis zu 3-fache an ($p < 0,05$ bzw $p < 0,01$).

Wir konnten ebenfalls feststellen, dass die NK-Zellmarker CD56 und CD16 in ihrer Expression durch IL-12 signifikant beeinflusst wurden. Die Expression von CD56 nahm

dabei zu, während die Expression von CD16 abnahm. Diesen Einfluss von IL-12 untersuchten wir näher bei der Analyse der durch CD56 und CD16 charakterisierten NK-Subpopulationen (s. 3.3). NK-Zellen können durch CD56, die 140-kDa Isoform des neuronalen Zelladhäsionsmolekül (NCAM)[28], und durch die Abwesenheit des T-Zell-Markers CD3 charakterisiert werden. CD16 wird in unterschiedlichem Maße auf NK-Zellen exprimiert. Es bindet an die Fc-Region von Immunglobulinen, welche an der Oberfläche der Zielzelle (i.e. Tumorzelle) gebunden sind. Daraufhin kommt es zur Aktivierung der NK-Zelle und zum Zelluntergang der Zielzelle. Dieser Vorgang wird als *antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC)* beschrieben.

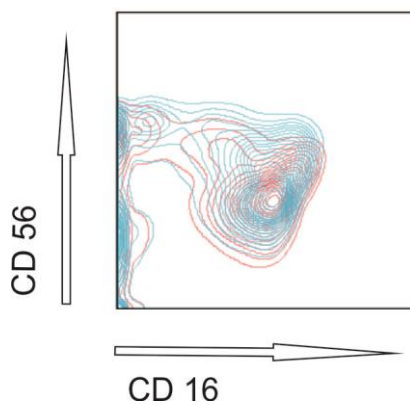


Abb. 7: IL-12 beeinflusst die Expression von CD 56 und CD 16

Gezeigt ist ein beispielhafter Contour-Plot aus zwei überlagerten Populationen. Inkubation für 48h. Rot = IL-2 (50IU/ml), Blau = IL-2 + IL-12 (10ng/ml). Der blaue Plot ist nach oben verschoben. Die Pfeile zeigen die zunehmende Expression des jeweiligen Markers auf der x- bzw. y-Achse an.

3.1.2 Expressionssteigerung von DNAM-1 in Abhängigkeit der Inkubationszeiten mit IL-12

Als nächstes untersuchten wir die Expression der Rezeptoren DNAM-1, CD96 und TIGIT in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit IL-12. Dafür wählten wir zwei Inkubationszeiten (18h und 48h) und verglichen die Expressionsraten miteinander. Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung von NK-Zellen mittels IL-12 von der Länge der Inkubationszeit abhängt [23]. Die Ergebnisse und der Versuchsaufbau sind in Abb. 8 dargestellt.

Die Expressionsmuster nach 48h Inkubation mit IL-12 sind vereinbar mit den schon zuvor beobachteten Ergebnissen (Zunahme von DNAM-1 und CD96 bei Abnahme von TIGIT; s. 3.1.1). Auffallend ist, dass es nach 18h Inkubation mit IL-12 noch nicht zu dem erwarteten Anstieg von DNAM-1 kommt. Bei CD96 und TIGIT werden die Unterschiede nach 48h ebenfalls deutlicher erkennbar.

Die Veränderung in der Rezeptorexpression durch IL-12 scheinen demnach ein erst später einsetzender Effekt zu sein. Die Auswirkungen auf die Zytotoxizität der NK-Zellen werden in den Ergebnissen des Caspase-Assays näher erläutert.

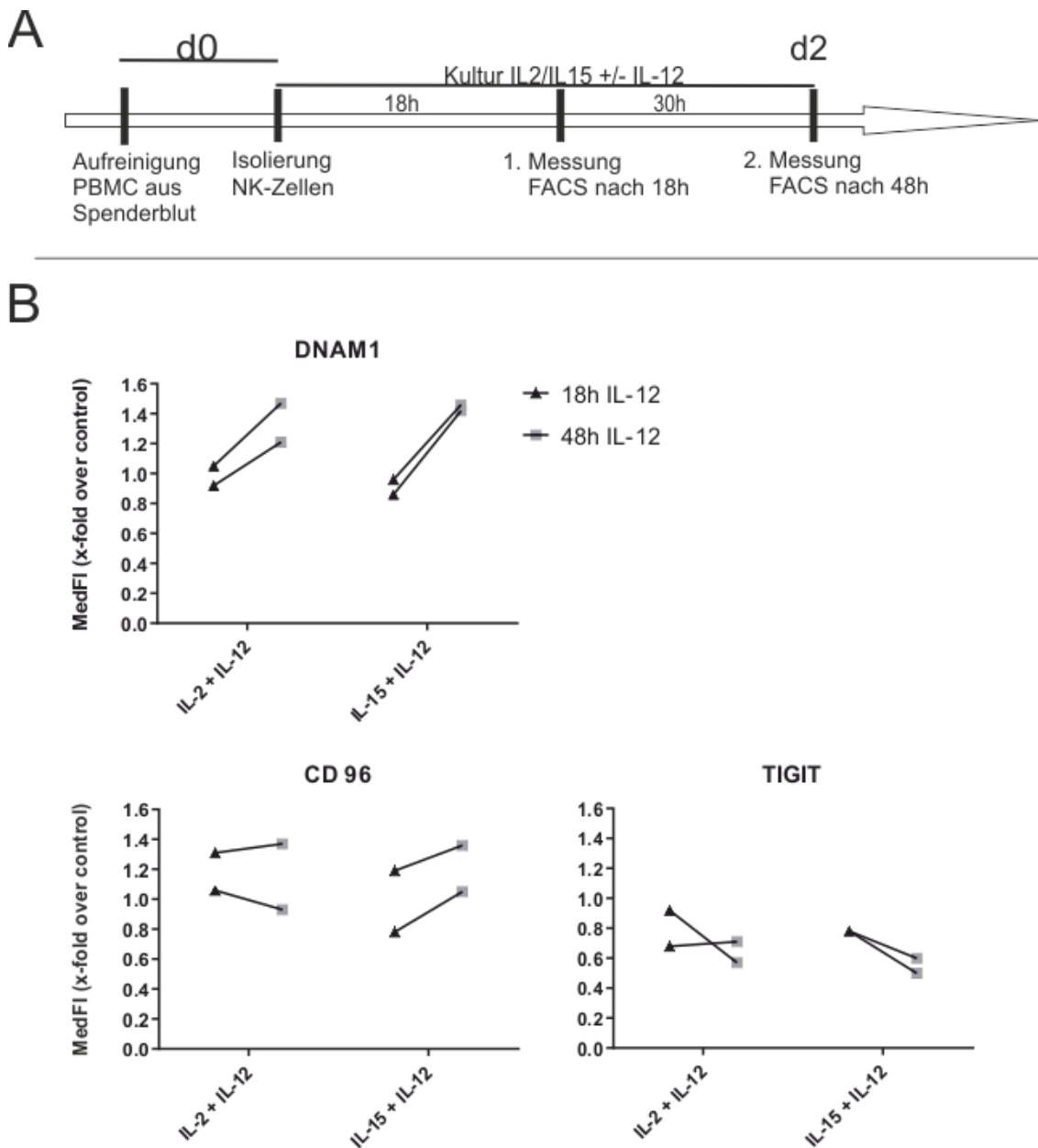


Abb. 8: A. Zeitlicher Ablauf der Experimente. B. Expression der Rezeptoren DNAM-1, CD-96 und TIGIT auf NK-Zellen im Vergleich von 18h vs. 48h Stimulationszeit mit IL-12

Gezeigt sind nur die relativen Veränderungen des MedFl der Interventionsgruppe (IL-2 bzw. IL-15 + IL-12) zur Kontrollgruppe (IL2 bzw IL15 ohne IL-12) jeweils nach 18h bzw 48h Inkubation mit IL-12. Daten aus 2 Versuchen.

3.2 Stimulation von 7-Tagen kultivierten NK-Zellen mit IL-12 für 48h

Um herauszufinden, ob eine längere Aktivierungszeit *in vitro* mit IL-2/IL-15 etwas an dem Einfluss von IL-12 auf die Rezeptoren verändert, wurden die NK-Zellen nach der Aufreinigung für sieben Tage mit IL2/IL-15 inkubiert. Die Zytokine wurden dabei alle 2-3 Tage erneuert. Anschließend wurden die Zellen wieder für 48h \pm IL-12 inkubiert.

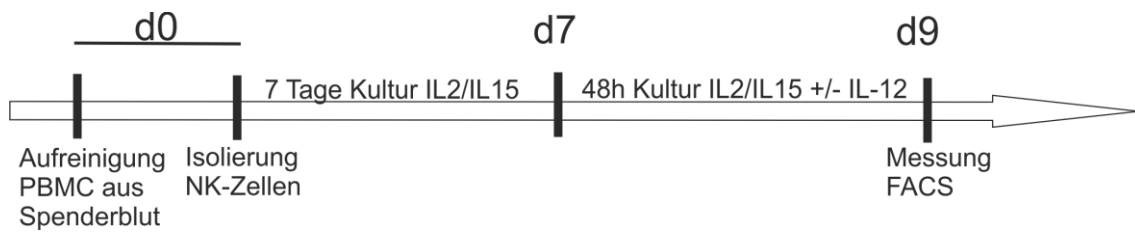


Abb. 9: Zeitlicher Ablauf der Experimente

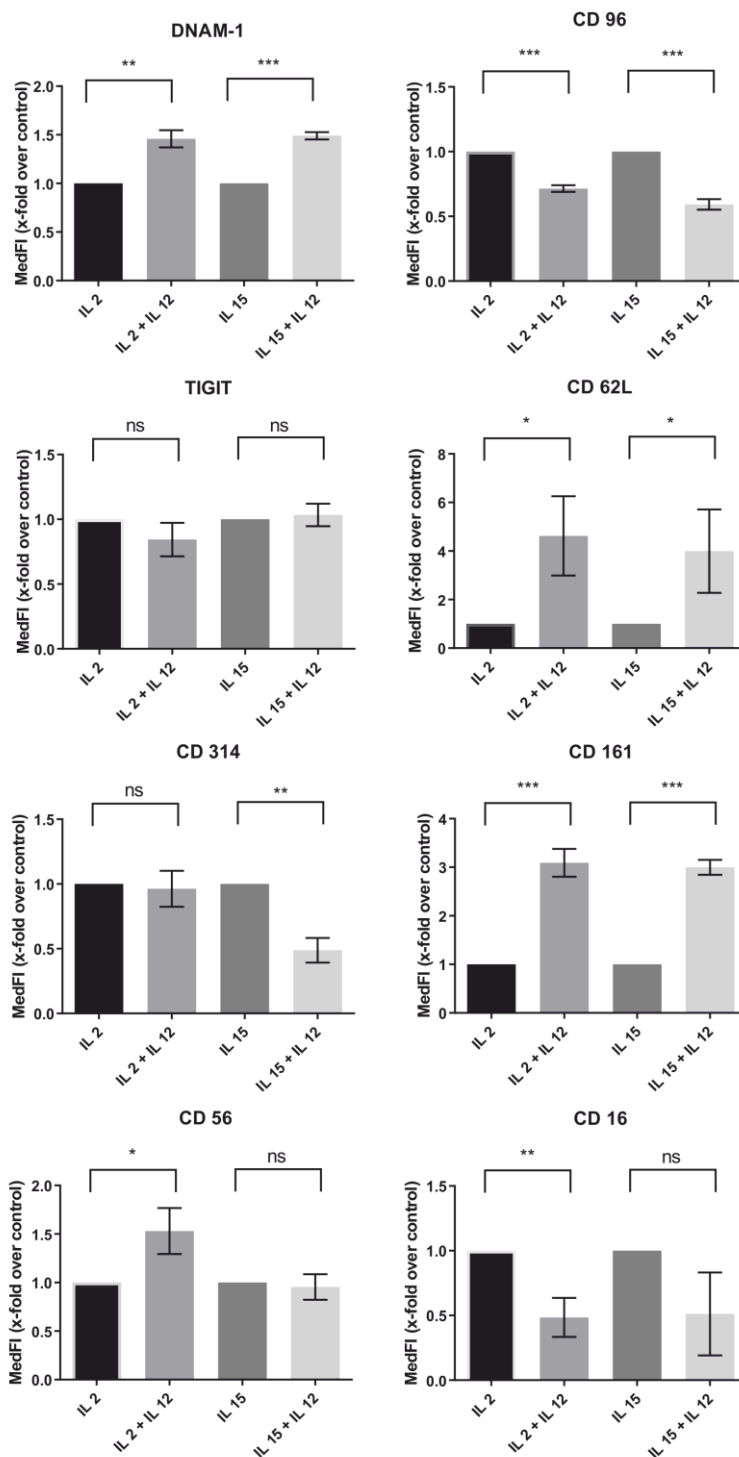


Abb. 10: Stimulation von 7 Tage alten NK-Zellen

Experimenteller Aufbau: Am Tag 0 wurden die NK-Zellen aus PBMC aufgereinigt und mit IL-2 (50IU/ml) oder IL-15 (5ng/ml) inkubiert. Am Tag 3 und 5 wurde das Medium mit frischen Zytokinen gewechselt. Am Tag 7 erfolgte erneuter Mediumwechsel und die Zugabe von IL-12 (10ng/ml). Am Tag 9 Färbung und Messung am FACS. Als Kontrollen dienten die IL-2 bzw. IL-15 Gruppe. Ergebnisse zusammengefasst von 4 Experimenten. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; ns = nicht signifikant

3.2.1 IL-12 bewirkt eine Herabregulation von CD96

Die Expression von DNAM-1 ließ sich bei den für 1 Woche vorkultivierten NK-Zellen nach 48h Inkubation mit IL-12 ebenfalls um das 1,5-fache steigern (s. Abb. 10).

Die Expression von TIGIT blieb dagegen fast unverändert.

Interessanterweise sank dagegen im Unterschied zu den nur kurz in Kultur gehaltenen (48h) NK-Zellen die Expression von CD96 bei den für 1 Woche vorkultivierten NK-Zellen um ca. 30% (IL-2 Gruppe) bzw. 40% (IL-15 Gruppe) des Ausgangswertes ($p < 0,001$).

CD62L und CD161 zeigten beide eine stark gesteigerte Expression auf das über 4- bzw. 3-fache des Kontrollwertes. Im Vergleich dazu lag die gesteigerte Expressionsrate nach 48h IL-12 ohne Vorkultivierung bei CD62L beim 2,5-fachen. Die Expression von CD161 stieg in den beiden Versuchen (mit und ohne Vorkultivierung der NK-Zellen) um mehr als das 3-fache an.

Die Tendenz, welche wir schon nach 48h bei CD314 in der Gruppe IL-15 + IL-12 erkennen konnten, ist nach 7 Tagen Vorkultivierung noch ausgeprägter, sodass ein signifikanter Abfall von CD314 um die Hälfte gegenüber des Kontrollwertes zu verzeichnen ist ($p < 0,01$).

Schließlich war der Einfluss von IL-12 auf CD56 und CD16 nur in der IL-2 Gruppe signifikant. Hier deckten sich die Ergebnisse mit dem ersten Versuch, bei dem die Expression von CD56 hoch und die von CD16 herunterreguliert wurden.

3.3 NK Subpopulationen: CD56^{dim} CD16⁺ und CD56^{bright} CD16⁻

In der Literatur sind mehrere Subpopulationen von NK-Zellen beschrieben [2]. Die größte Gruppe bildet mit ca. 90% von im peripheren Blut befindlichen NK-Zellen die CD56^{dim}CD16⁺ Population. Darauf folgt mit ca. 10% die Gruppe der CD56^{bright} CD16^{dim/-} Population (s. Abb. 11). Die größere CD56^{dim} CD16⁺ Population besitzt eine höhere Zytotoxizität als die CD56^{bright} CD16^{dim/-} Population, bildet dafür allerdings weniger IFN- γ als die CD56^{bright} CD16^{dim/-} Population [2]. Des Weiteren unterscheiden sich die Populationen hinsichtlich ihrer Lokalisation im Körper. Während die CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen im peripheren Blut zirkulieren, sind CD56^{bright} CD16^{dim/-} NK-Zellen eher im parafollikulären Gewebe von sekundären lymphatischen Organen (Lymphknoten, Tonsillen) zu finden [3]. Obwohl es vermehrt Hinweise in der Literatur gibt, dass die CD56^{bright} Population eine Vorstufe in der Entwicklung zur „reifen“ CD56^{dim} Population sei [4], ist es ebenfalls möglich, dass beide Populationen getrennt voneinander unterschiedliche Aufgaben in der Aktivierung des Immunsystems übernehmen [2, 5].

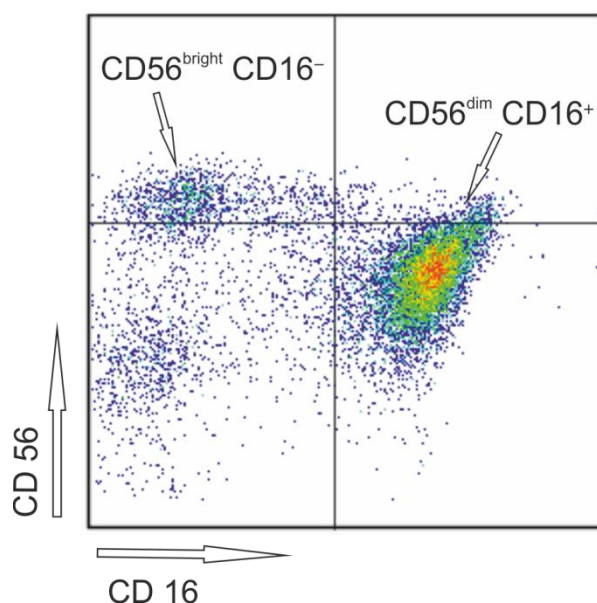


Abb. 11: NK-Zell-Subpopulationen

Anhand von CD56 und CD16 kann man die zwei größten Subpopulationen der NK-Zellen veranschaulichen.

Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass unter dem Einfluss von IL-12 die Gruppe der CD56^{bright}CD16^{dim/-} Zellen zunimmt, während die Zahl der CD56^{dim}CD16⁺ Zellen ab-

nimmt (Zunahme der Expression von CD56 und Abnahme von CD16, s. 3.1.1). Es stellte sich uns die Frage, ob es sich dabei tatsächlich um einen Übergang von der CD56^{dim}CD16⁺ Population zur CD56^{bright}CD16^{dim/-} Population handelt oder ob sich die CD56^{bright}CD16^{dim/-} Population in den 48h stärker vermehrt hat. Außerdem wollten wir wissen, ob die Subpopulationen unterschiedlich auf IL-12 reagieren.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden im späteren Verlauf die einzelnen Subpopulationen aufgereinigt und die Versuche in den Subpopulationen analog zu den vorherigen Versuchen in der Gesamtpopulation wiederholt.

3.3.1 Stimulation von CD56^{dim}CD16⁺ Zellen mit IL-12 für 48h

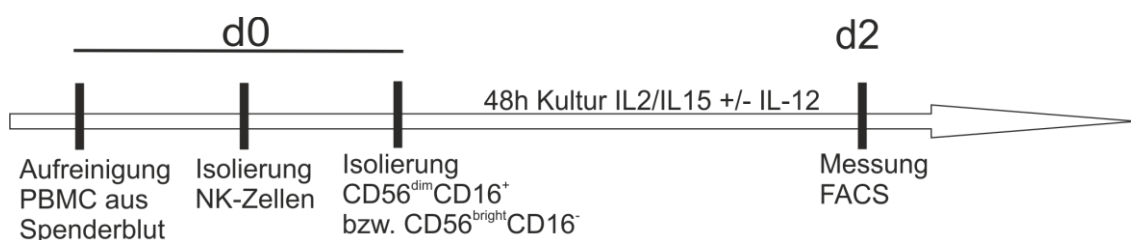


Abb. 12: Zeitlicher Ablauf der Experimente

Wie schon in den Versuchen zuvor steigt die Expression von DNAM-1 auch in der CD56^{dim} Subpopulation nach Stimulation mit IL-12 um das 1,5fache. Die Tendenz zur gesteigerten Expression von CD96 in Abb. 6 wird nach der Aufreinigung deutlicher sichtbar und statistisch signifikant ($p < 0,05$ bzw. $0,01$). TIGIT zeigt dagegen eine leichte Steigerung in der IL-2 Gruppe, während es in der IL-15 Gruppe zu einer Reduktion um fast die Hälfte kommt (s. Abb. 13 obere Reihe).

CD161 steigt durch die Stimulation wiederum stark um das 4fache an, während CD314 abnimmt. Bei CD62L kann man lediglich eine steigende Tendenz ablesen, die aber nicht signifikant ist (s. Abb. 13 mittlere Reihe). Zusätzlich haben wir drei Rezeptoren der NCR Familie untersucht: NKp30, NKp36 und NKp44. Es handelt sich dabei um für NK-Zellen spezifische Rezeptoren, welche wie CD314 (NK2GD) und DNAM-1 die NK-Zelle aktivieren und ihre Zytotoxizität steigern. Während wir bei NKp30 und NKp44 die Tendenz zu

einer gesteigerten Expression (nicht signifikant) beobachten konnten, blieb NKp36 unbeeinflusst durch die Zugabe von IL-12 (s. Abb. 13 untere Reihe).

Hingegen konnten wir die Beobachtung, dass IL-12 zu einer Zunahme von CD56 und einer Abnahme von CD16 führt, in der CD56^{dim} Subpopulation bestätigen (s. Abb. 13

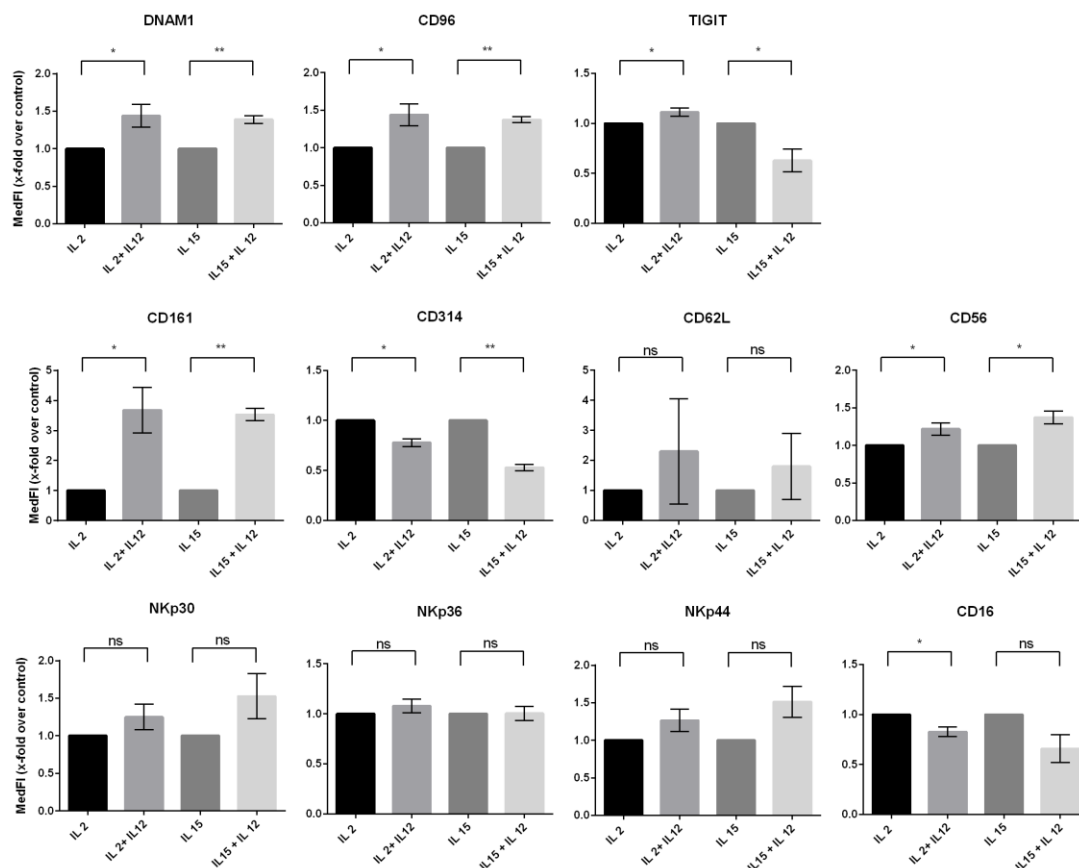


Abb. 13: Stimulation von CD56^{dim} CD16⁺ Zellen mit IL-12

Die NK-Subpopulation CD56^{dim} CD16⁺ wurde in 2 Schritten aus PBMC gewonnen und für 48h mit IL-2 (50IU/ml) oder IL-15 (5ng/ml) ± IL-12 (10ng/ml) inkubiert. Ergebnisse von 3 Experimenten. * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; ns = nicht signifikant.

mittlere und untere Reihe rechts). Da wir die CD56^{bright} NK-Population vor dem Versuch herausselektiert haben (s. 2.2.2.7), können wir annehmen, dass sich die Rezeptorverteilung teilweise von CD56^{dim}CD16⁺ zu CD56^{bright}CD16⁻ NK-Zellen verschoben hat.

3.3.2 Stimulation von CD56^{bright} CD16⁻ Zellen mit IL-12 für 48h

Die Aufreinigung und Kultivierung der CD56^{bright} CD16⁻ Population erwies sich als wesentlich schwieriger, da die Population kleiner ist als CD56^{dim}CD16⁺ (s. Diskussion). Nach sieben Tagen Kultur haben nicht genügend Zellen für die Versuche überlebt, daher führten wir nur die Versuche über 48h durch.

Während DNAM-1 offenbar in beiden Subpopulationen den gleichen Anstieg (1,5fach) aufweist, konnten wir interessante Unterschiede bei den Rezeptoren TIGIT und CD96 ausmachen: TIGIT weist im Unterschied zur CD56^{dim} Population in der CD56^{bright} Population eine steigende Tendenz auf, während CD96 hier wiederum im Gegensatz dazu abfällt (s. Abb. 14 obere Reihe).

CD161 zeigt einen kleineren, aber immer noch deutlichen Anstieg. CD314 zeigt keine wesentlichen Unterschiede. CD62L steigt nur in der IL-15 Gruppe an (s. Abb. 14 mittlere Reihe).

Von den drei Zytotoxizitätsrezeptoren blieben NKp30 und NKp44 fast unverändert, allerdings fällt NKp36 in der IL-15 Gruppe extrem ab (s. Abb. 14 untere Reihe).

CD56 (steigt) und CD16 (fällt) zeigen den gleichen Trend wie in der CD56^{dim} Population allerdings nicht in dem Maße ausgeprägt, wahrscheinlich da die Population bereits CD56^{bright} CD16^{dim/-} ist (s. Abb. 14 mittlere und untere Reihe rechts).

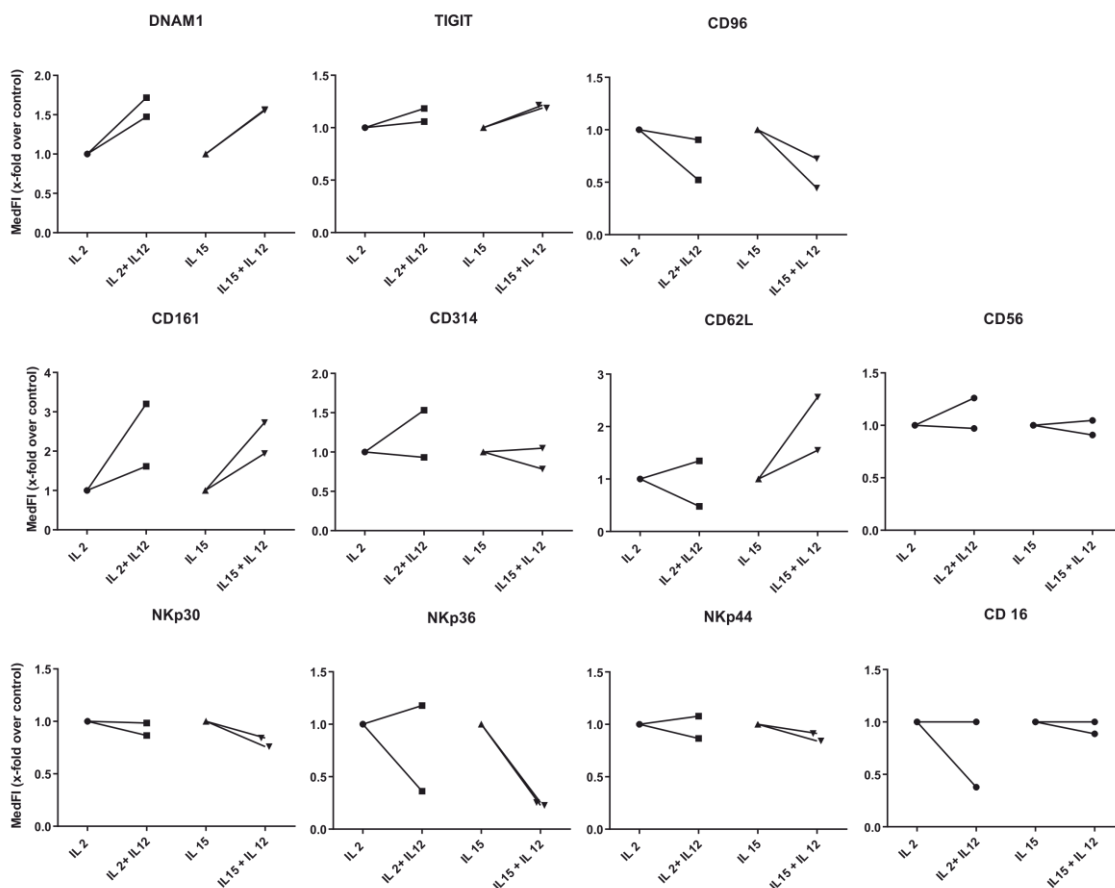


Abb. 14: Stimulation von CD56^{bright} CD16⁻ Zellen mit IL-12

Die NK-Subpopulation CD56^{bright} CD16⁻ wurde in 2 Schritten aus PBMC gewonnen und für 48h mit IL-2 (50IU/ml) oder IL-15 (5ng/ml) ± IL-12 (10ng/ml) inkubiert. Ergebnisse von 2 Experimenten.

Zusammenfassend zeigt sich eine sehr konstante Hochregulation von DNAM-1 unter IL-12, welche auch in den Subpopulationen gleichermaßen zu finden ist. Unterschiede sind vor allem bei den Gegenspielern CD96 und TIGIT zu finden. CD96 steigt in der CD56^{dim} Population, fällt aber in der CD56^{bright} Population, während sich TIGIT in der IL-15 Gruppe gegensätzlich verhält.

3.4 Regulation von CD 112/CD 155 auf ES- und Melanom-Zelllinien durch IFN- γ und IL-1 α

DNAM-1 und TIGIT teilen sich die Liganden CD 112 und CD 155, während CD96 nur den Liganden CD 155 mit DNAM-1 teilt [18]. Allerdings besitzen DNAM-1, TIGIT und CD96 unterschiedliche Affinitäten für die Liganden: TIGIT besitzt die höchste Affinität zu CD155 (1-3nM), darauf folgt CD96 (37,6nM) und DNAM-1 (114-119nM) [13]. Für CD112 ist die Affinität von TIGIT und DNAM-1 jeweils als gering angegeben [13]. Als Vorbereitung zu dem anschließenden funktionellen Caspase-Assay wollten wir nun untersuchen, ob es uns gelingt, eine Hochregulation der Liganden auf den später zu untersuchenden Tumorzelllinien zu bewirken. Da DNAM-1 aufgrund seiner niedrigeren Affinität von einer erhöhten Expression der Liganden profitieren müsste, könnte dadurch eventuell die Zytotoxizität der NK-Zellen im Caspase Assay gesteigert werden.

Die untersuchten ES-/Melanom-Tumorzelllinien besitzen eine unterschiedlich hohe Expression von CD112 bzw. CD155 (s. Anhang, Tabelle 6).

Dies wurde berücksichtigt bei der Auswahl geeigneter Zelllinien für den funktionellen Assay (s. 3.5). Da nicht alle Zelllinien vergleichbar gut in Kultur gewachsen sind, konnten nicht alle Zellreihen getestet werden.

CD112 und CD155 werden durch zellulären Stress hochreguliert [29]. Simulatoren für zellulären Stress sind in unserem Experiment die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-1 α . In Kombination mit IL-1 α führt IFN- γ zu einer Hochregulation von CD155 auf humanen, vaskulären Endothelzellen (HUVEC) [29]. Zudem wird IFN- γ in großem Maße von NK-Zellen, insbesondere von der CD56^{bright} Population, produziert.

3.4.1 IFN- γ steigert die Expression von CD112 und CD155 auf SK-ES-1 Zellen

Bei SK-ES-1 stellten wir eine nachweislich gesteigerte Expression von CD112 und CD155 durch IFN- γ fest. Sie ist unabhängig von der Zugabe von IL-1 α . SK-ES-1 besitzt von den Zellreihen eine mittelgradige Expression von CD112/CD155.

Die Untersuchung mehrerer anderer Zellreihen (FM55, T6217; RD-ES, SK-NM-C, TC71) ergab keine Veränderung der Expressionsraten von CD112 und CD155 durch IFN- γ \pm IL-1 α (mind. 2 Experimente; Ergänzende Abbildungen 1-5 im Anhang).

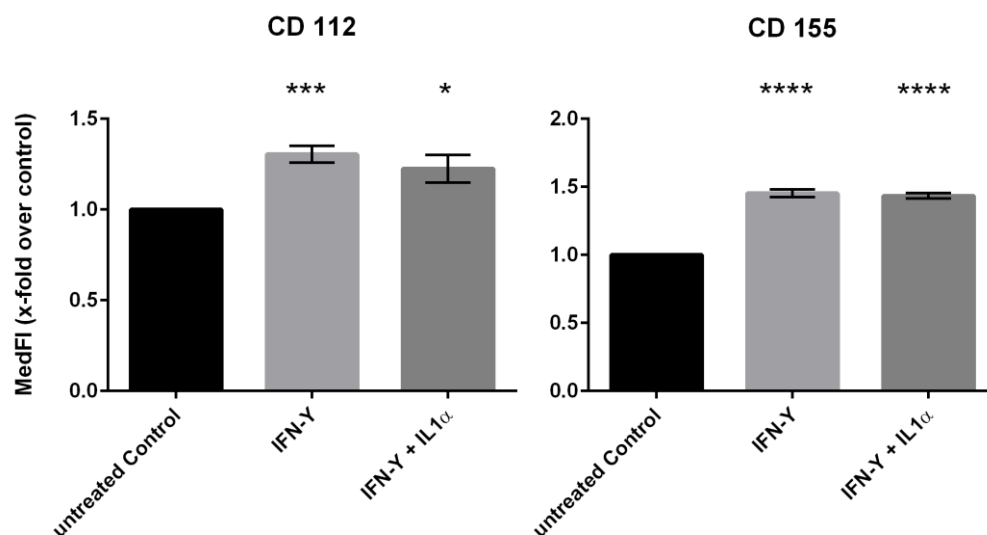


Abb. 15: IFN- γ steigert die Expression von CD112 und CD155 auf SK-ES-1 Zellen

Es wurden 200.000 Zellen/well ausgesät und mit IFN- γ (100ng/ml) \pm IL-1 α (10ng/ml) für 48h bei 37°C inkubiert. Als Kontrollen dienten unbehandelte SK-ES-1 Zellen und Isotype (PE) Kontrollen. Ergebnisse von 4 Experimenten. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Escalante *et al.* (2011) setzten in ihren Versuchen an HUVEC zusätzliche proinflammatorische Zytokine wie IL-6 (50ng/ml) und TNF- α (100ng/ml) ein [29]. Daher führten wir ebenfalls einen Versuch mit SK-ES-1 Zellen durch, in dem wir die Auswirkung der 4 Zytokine alleine und in verschiedenen Kombinationen (IFN- γ + IL-1 α ; IFN- γ + TNF- α ; IFN- γ + IL-1 α + IL-6; IFN- γ + IL-1 α + TNF- α ; IFN- γ + IL-1 α + IL-6 + TNF- α) auf die Expression von CD155 gemessen haben.

Dabei zeigte sich, dass es vor allem unter Zugabe von IFN- γ zu einer Steigerung der Expression von CD155 ($p < 0,0001$) kommt. Die anderen Zytokine konnten weder alleine noch in Kombination mit IFN- γ eine zusätzliche Steigerung der Expression von CD155 bewirken (Ergänzende Abb. 6 im Anhang).

Zusammengefasst konnten wir nur in einer der untersuchten Tumorzelllinien (SK-ES-1 Zellen) eine Steigerung der Expression von CD112 und CD155 nachweisen. Die Steigerung der Expression wurde vor allem durch IFN- γ bewirkt, während die anderen Zytokine alleine oder in Kombination mit IFN- γ keine Auswirkungen auf die Expression hatten.

3.5 Funktioneller Caspase Assay

Wir konnten nachweisen, dass IL-12 verschiedene Rezeptoren der NK-Zellen unterschiedlich beeinflusst. DNAM-1 wurde dabei konsequent um das 1,5fache hochreguliert. DNAM-1 ist als NK-Zell-aktivierender Rezeptor (Zytotoxizität steigernd) bekannt und unsere Arbeitsgruppe konnte vor kurzem zeigen, dass IL-12 via DNAM-1 bei T-Zellen einen Apoptose-induzierenden Signalweg aktiviert, welcher unabhängig vom T-Zell-Rezeptor agiert (HLA-unabhängig) [20]. Daher wollten wir klären, ob die Veränderung im Rezeptor-Phänotyp auch Auswirkungen auf die Zytotoxizität der NK-Zellen hat.

Dafür wurden die NK-Zellen zunächst durch Interleukin Behandlung mit IL-12 aktiviert (s. Kapitel 2.2.3) und nach 48h mit Ewing-Sarkom-Zellen (ES-Zellen) bzw. Melanom-Zellen zusammengebracht (für eine genauere Beschreibung s. Kapitel 2.2.5). Nach 4h Inkubation wurde der Anteil der Caspase-3 positiven Tumorzellen am FACS gemessen. NK-Zellen können bei zu eliminierenden Zellen über die Induktion des Caspase-Komplexes die Apoptose dieser Zellen einleiten. Caspase-3 positive Zellen sind also Zellen, die sich am Anfang der Apoptose befinden. Der Anteil Caspase-3 positiver Zellen an der Gesamtpopulation der Tumorzellen dient dabei als indirekter Marker für die Zytotoxizität der NK-Zellen. Um den Einfluss von DNAM-1/CD96 auf die Zytotoxizität zu untersuchen, wurden ein Teil der NK-Zellen zuvor für 1h mit blockierendem Antikörper behandelt. Außerdem wurden von den NK-Zellen des jeweiligen Assays das Expressionsmuster der Rezeptoren DNAM-1, TIGIT und CD96 untersucht, um die funktionellen Auswirkungen mit denen auf Rezeptorexpressionsebene zu vergleichen. Zudem wollten wir den Einfluss von unterschiedlich langen Inkubationszeiten der NK-Zellen mit IL-12 (18h vs. 48h) untersuchen, da es in der Literatur Hinweise dazu gibt, dass eine kür-

zere Inkubation von IL-12 (18h) die NK-Zellen effektiver aktiviert als eine lange Stimulation [23].

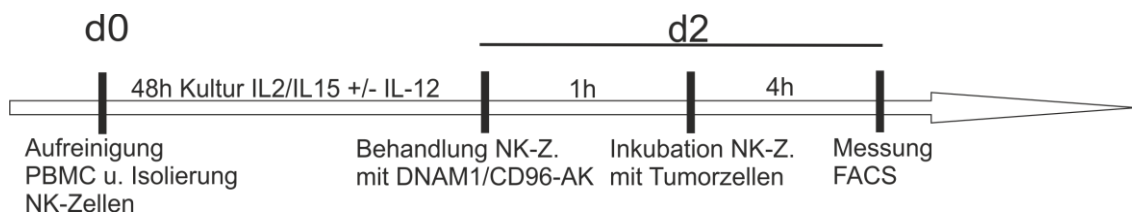


Abb. 16: Zeitlicher Ablauf der Experimente

Es wurden mehrere Zellreihen unter Berücksichtigung von Tab.1 getestet (RD-ES, SK-ES-1, TC71, T6217 und FM55). Aufgrund guten Wachstums in Kultur und niedriger Spontan-Apoptose Raten entschieden wir uns für die Zelllinien SK-ES-1 (Ewing-Sarkom-Zellen), FM55 (Melanom-Zellen) und TC71 (Ewing-Sarkom-Zellen).

Die Expression der Liganden von DNAM-1, TIGIT und CD96 (CD112 und CD155) ist bei TC71 höher als bei SK-ES-1 und FM55 (Ausnahme CD155 von FM55). Das Ausmaß der Expression der Liganden kann die Zytotoxizität der NK-Zellen beeinflussen, wobei berücksichtigt werden sollte, dass auf NK-Zellen viele verschiedene Rezeptoren zur Aktivierung bzw. Zytotoxizität der Zellen beitragen.

3.5.1 Analyse der Zytotoxizität der NK-Zellen

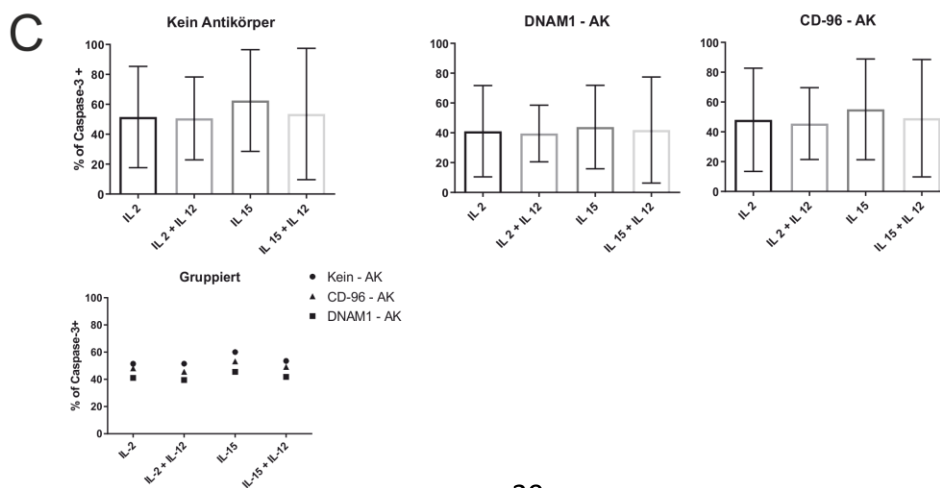
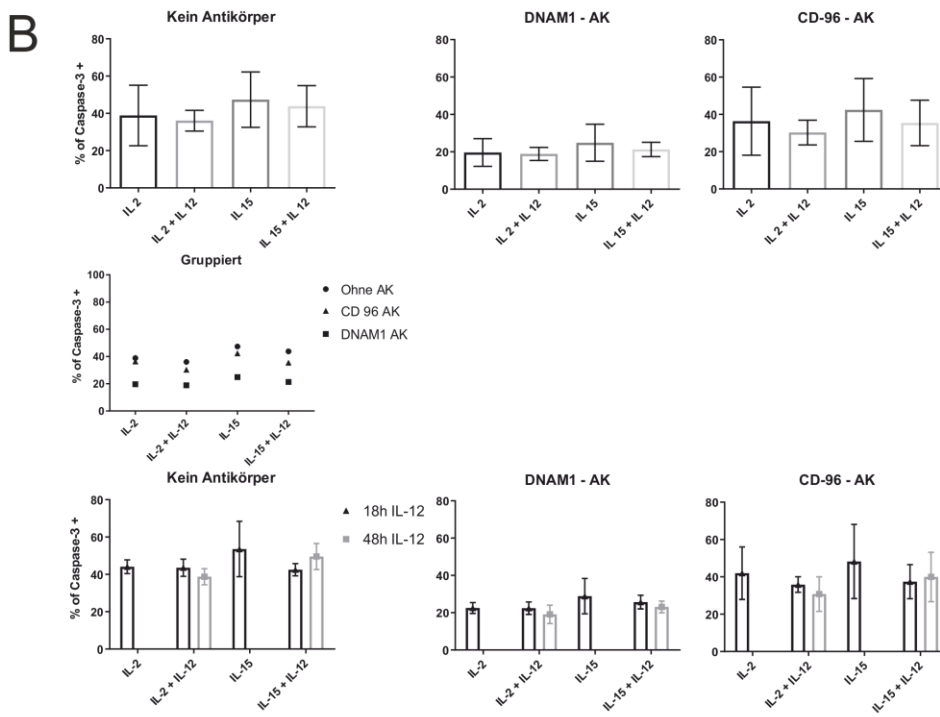
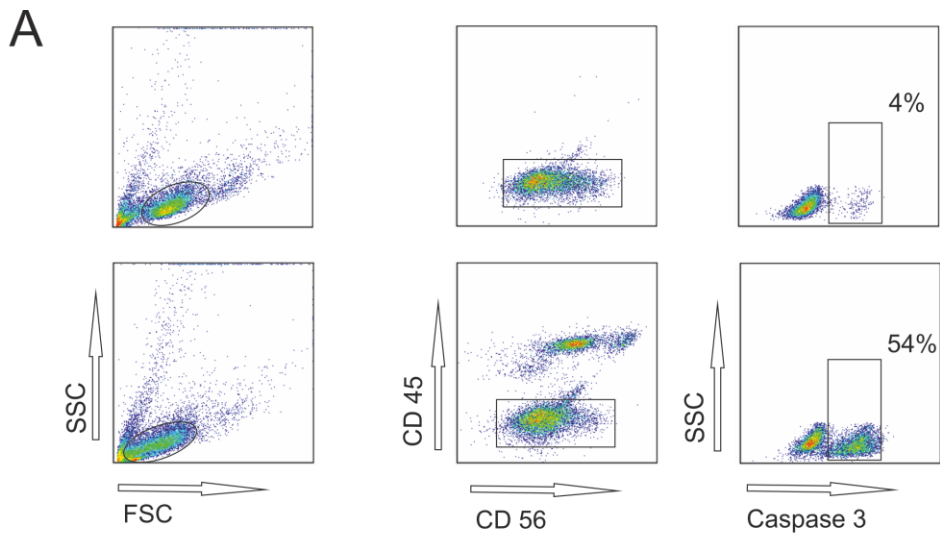


Abb. 17: IL-12 verstärkt nicht die Zytotoxizität von NK-Zellen

A. Representative Gating Strategie. *Obere Reihe:* Nur SK-ES-1 Zellen zur spontanen Apoptose-Rate Bestimmung. *Untere Reihe:* SK-ES-1 und NK-Zellen (für 48h mit IL-2 behandelt). Unterscheidung der Populationen anhand der Marker CD45 und CD56. Indirekter Messparameter für die Zytotoxizität der NK-Zellen ist der prozentuelle Anteil von Caspase-3⁺ Tumorzellen.

B. SK-ES-1. *Obere Reihe:* Bestimmung der Caspase-3⁺ SK-ES-1 Zellen. Die NK-Zellen wurden vor dem Caspase Assay in 3 Gruppen geteilt und mit blockierendem Antikörper gegen DNAM-1 (10µg/ml) bzw. CD96 (10µg/ml) für 1h bei 37° inkubiert (3 Experimente). *Mittlere Reihe:* Abbildung der Zytotoxizitätswerte der 3 NK-Zell-Gruppen (nur Mittelwerte angezeigt); *Untere Reihe:* Vergleich von 18h vs. 48h Stimulationszeit der NK-Zellen mit IL-12 (10ng/ml) (2 Versuche). Alle Ergebnisse bis auf eines waren nicht statistisch signifikant = $p > 0,05$. * $p < 0,05$.

C. TC-71. Experimente wurden analog zu (B) durchgeführt (3 Experimente). Alle Ergebnisse waren statistisch nicht signifikant = $p > 0,05$.

Die aussagekräftigsten Ergebnisse des Assays wurden mit SK-ES-1 Zellen erzielt. Hierbei zeigten sich gleich mehrere Ergebnisse. Jene NK-Zellen, die mit IL-15 behandelt wurden, waren zytotoxischer als diejenigen Zellen, welche mit IL-2 behandelt wurden. Außerdem stellten wir fest, dass, obwohl IL-12 DNAM-1 hochreguliert, es die Zytotoxizität der NK-Zellen nicht steigert. Im Gegenteil zeigen unsere Ergebnisse eher eine Abnahme der Zytotoxizität unter IL-12 (Abb. 17B, obere Reihe).

Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Inhibition von DNAM-1 mittels Antikörper die Zytotoxizitäts-Rate auf die Hälfte reduziert (Abb. 17B, mittlere Reihe). Diese Ergebnisse verdeutlichen die wichtige Rolle von DNAM-1 für eine funktionierende lytische Funktion der NK-Zellen. IL-12 scheint diese Rolle aber nicht zu beeinflussen.

Die Inhibition von CD96 hat dagegen einen sehr viel geringeren Einfluss auf die Aktivität der NK-Zellen. Hier zeigen sich die Werte nur knapp unter denen von nicht behandelten NK-Zellen (Abb. 17B, obere und mittlere Reihe). Bei Zugabe von IL-12 bewirkt die Inhibition von CD96 einen etwas größeren Abfall der Caspase-3⁺ - Raten.

Bei den Versuchen mit TC71 Zellen blieb die Aktivität der NK-Zellen unter dem Einfluss von IL-12 entweder gleich oder nahm leicht ab (Abb. 17C, obere Reihe). Inhibition von DNAM-1 bewirkte hierbei eine Reduktion der Zytotoxizität um max. 30% (Abb. 17C, untere Reihe). Bei Inhibition von CD96 wurde die Zytotoxizität um max. 15% gesenkt.

Als letztes wurde der Einfluss unterschiedlich langer Inkubationszeiten von IL-12 mit NK-Zellen untersucht, um zu bestimmen, ob diese einen Einfluss auf die Zytotoxizität hat. Dabei fielen unterschiedliche Ergebnisse auf: Während in der IL-2 Population die Zytotoxizität mit längerer IL-12 Inkubation tendenziell leicht abnahm, nahm sie in der IL-15 Population mit der Zeit zu (Abb. 17B, untere Reihe). Die Unterschiede sind allerdings relativ klein (Mittelwert: 43% zu 38% bzw. 42,5% zu 49,5%) und liegen außerdem unterhalb der Kontrollwerte von alleiniger Inkubation mit IL-2 bzw. IL-15. Wir konnten daher die Aussage von Wang *et al.* (2000) nicht bestätigen, dass eine kürzere Inkubation mit IL-12 die Aktivität der NK-Zellen steigert [23]. Zudem zeigen unsere Beobachtungen auf Rezeptorexpressionsebene (Abb. 8), dass nach 18h noch keine Veränderungen in der DNAM-1/TIGIT/CD96 - Achse sichtbar sind.

Die Experimente mit FM55-Zellen zeigten einen Anstieg der Caspase-3⁺ Rate (um ca. das 6-fache auf 20%), welcher allerdings in einem 2. Experiment nicht bestätigt werden konnte. Zugabe von IL-12 hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die gemessene Zytotoxizität. Die Caspase-3⁺ Werte nach Induktion mit NK-Zellen waren insgesamt deutlich niedriger als bei SK-ES-1 oder TC71 (s. Ergänzende Abb. 7 im Anhang).

4 Diskussion

4.1 IL-12 zeigt große Auswirkungen auf die Rezeptor-expressionen an der NK-Zelloberfläche

IL-12 ist bekannt als aktivierendes Signal für T-Zellen und NK-Zellen. Unsere Arbeitsgruppe fand bei T-Zellen einen IL-12 vermittelten Signalweg, welcher gesteuert über den DNAM-1 Rezeptor ist und unabhängig vom TCR/HLA-System zur gesteigerten Tumorabwehr führt [20]. DNAM-1 gehört wie CD96 und TIGIT zu einer Rezeptor Familie, welche mit Nektin und Nektin-ähnlichen Molekülen interagieren [21]. Es gibt immer mehr Belege dafür, dass diese Familie eine wichtige Rolle in der lytischen Funktion von NK-Zellen gegenüber virus-infizierten Zellen und Tumorzellen einnimmt [14, 21].

Die Zugabe von IL-12 hat die Rezeptorausprägung auf den NK-Zellen merklich verändert. Man hätte vermuten können, dass IL-12 als aktivierendes Signal die Gruppe der aktivierenden Rezeptoren hoch- und die der inhibierenden Rezeptoren runterreguliert. Allerdings zeigen unsere Ergebnisse ein komplexeres Bild.

Die Expression von DNAM-1 steigt zwar in den verschiedenen Versuchen konstant an, allerdings wurde auch meist einer der Gegenspieler CD96 und TIGIT, die um den gleichen Liganden CD155 konkurrieren, hochreguliert. Dieses Phänomen wurde deutlicher, als wir die Versuche in den Subpopulationen wiederholten (Abb. 13 und 14). Nach längerer Kultur mit IL-2/15 fällt CD96 jedoch ab, ohne dass TIGIT kompensatorisch hochreguliert wird (Abb. 10). DNAM-1 erhält dadurch einen Vorteil im Wettstreit um den gemeinsamen Liganden CD155 und das Gleichgewicht wird sich vermehrt in Richtung Aktivierung verlagern.

Wir konnten demnach feststellen, dass die Inkubation frisch isolierter NK-Zellen mit IL-12 in Kombination mit IL-2 oder IL-15 für 48h nicht reichte, um das Gleichgewicht der drei Rezeptoren auf die eine oder andere Seite zu verlagern. Kombiniert man dagegen eine längere Aktivierung der NK-Zellen *in vitro* mit einer kurzzeitigen Inkubation mit IL-12, bewirkt dies die Verlagerung hin zur Achse von DNAM-1.

Wenn wir uns den Einfluss von IL-12 auf die Expressionsrate, gemessen an der MedFl anschauen, wird deutlich, dass die größte Steigerung in der Expression nicht bei DNAM-1 lag, sondern bei den Rezeptoren CD161 und CD62L. CD161 dient zur Erkennung körpereigener Zellen und zur Selbsttoleranz, indem es ein inhibierendes Signal an die NK-Zelle weitergibt [27]. Es bietet dabei einen zusätzlichen Mechanismus zur Selbsttoleranz zu dem der MHC-spezifischen *Killer-cell immunoglobulin-like receptors* (KIR) Familie. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-12 auf NK-Zellen sowohl die Expression von inhibierenden wie auch von aktivierenden Rezeptoren steigert.

CD62L, welches den NK-Zellen den Übertritt aus dem Blut über hochendotheliale Venolen ermöglicht, reagiert mit einer ähnlich starken Hochregulation auf IL-12.

Die Hochregulation von CD161 und CD62L könnte ein Reifungsschritt von NK-Zellen unter IL-12 Einfluss sein, da reife, im peripheren Blut zirkulierende NK-Zellen sowohl in der Lage sein müssen, eigene Zellen zu erkennen, als auch die Möglichkeit aus dem Blut ins Gewebe überzutreten. Juelke *et al.* (2010) zeigten zudem, dass CD62L eine polyfunktionale Subpopulation von CD56^{dim} NK-Zellen beschreibt, welche eine intermediäre Rolle zwischen CD56^{bright} und CD56^{dim} NK-Zellen einnimmt, da sie die Funktionen beider Subpopulationen kombiniert: CD62L⁺ CD56^{dim} Zellen produzieren nach Stimulation IFN- γ und besitzen zudem eine hohe Zytotoxizität [24]. Da CD62L aber in beiden Subpopulationen vorhanden ist (Abb. 13 und 14) und bei beiden tendenziell durch die Behandlung mit IL-12 ansteigt, ist es kein ausschließlicher Marker für die von Juelke beschriebene Subpopulation.

Diese Arbeit hat zudem gezeigt, dass mit großer Wahrscheinlichkeit die Vermehrung von CD56^{bright} NK-Zellen nach 48h IL-12 Inkubation durch eine Umwandlung von CD56^{dim} NK-Zellen zu ebendiesen geschieht und nicht durch eine reine Proliferation schon vorhandener CD56^{bright} NK-Zellen. In der Literatur wird diese CD56^{bright} Population als vermeintlich „unreif“ beschrieben, da Ihnen durch die Abwesenheit von CD16 auch die Fähigkeit zur Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) fehlt [2]. Es gibt aber ebenfalls Hinweise dafür, dass es sich bei den NK Subpopulationen CD56^{dim} und CD56^{bright} um 2 enddifferenzierte Zellgruppen mit unterschiedlichem Aufgabenfeld handelt [30].

Die oben beschriebenen Veränderungen in den Rezeptoren CD161, CD62L, CD56 und CD16 unter IL-12 Einfluss sind vor uns auch schon von Matthew J. Loza *et al.* (2004) beobachtet worden [30]. Sie stellen die These auf, dass CD56^{bright} Zellen keine unreife Vorläufer Population, sondern eine eigenständige, enddifferenzierte Population aus dem großen Pool der CD56⁺ NK-Zellen darstellt, welche kurz zuvor mit IL-12 aktiviert wurde. Als Begründung führen sie unter anderem an, dass die CD56^{bright} Population alle Rezeptoren der CD56^{dim} Population mit gleichem oder höheren Level exprimieren mit Ausnahme von CD16. Alle von uns beobachteten Rezeptoren waren ebenfalls auf beiden Subpopulationen vorhanden (s. 3.3.2).

In welchem Verhältnis die beiden Subpopulation miteinander stehen, ist nicht endgültig geklärt. Neuere *in vivo* und *in vitro* Experimente unterstützen die These, dass CD56^{bright} NK-Zellen nicht nur eine funktionell eindeutig abgrenzbare Population von NK-Zellen darstellt, sondern auch als direkte Vorläufer von CD56^{dim} NK-Zellen fungieren [31]. Wir konnten hier zeigen, dass IL-12 *in vitro* CD56 hoch und CD16 herunterreguliert, welches für eine Differenzierung von CD56^{dim}CD16⁺ zu CD56^{bright}CD16⁻ NK-Zellen spricht.

4.2 IFN- γ steigert die Expression der Liganden für DNAM-1 auf SK-ES-1-Zellen

Bevor wir die Funktion der NK-Zellen im Caspase Assay untersuchten, haben wir uns die Veränderung der Ausprägung der Liganden für DNAM-1 bei simuliertem Zellstress auf den zu untersuchenden Tumorzellen angesehen. Bei einer der untersuchten Tumorzelllinien (SK-ES-1) konnten wir dabei feststellen, dass IFN- γ die Expression von den Liganden für DNAM-1 zu steigern vermag. Eine gesteigerte Expression könnte die Bindung für DNAM-1 erleichtern und damit auch die Zytotoxizität der NK-Populationen steigern. IFN- γ ist eines der wichtigsten Zytokine, welches von der CD56^{bright} NK-Population sezerniert wird. An dieser Stelle könnte man einen Link zwischen den beiden NK Subpopulationen vermuten: Die CD56^{bright} Zellen helfen den wesentlich zytotoxischeren CD56^{dim} Zellen bei ihrer Aufgabe Tumorzellen zu vernichten, indem sie ihnen das Andocken an ebendiesen Zellen durch Sekretion von IFN- γ erleichtern.

Allerdings werden die Liganden CD112 und CD155 wie bereits erwähnt auch von den hemmenden Rezeptoren CD96 und TIGIT gebunden. Die Interaktionen von

CD112/CD155 mit ihren Liganden sind damit ein hochkomplexes Regelsystem. Zudem ist es wichtig zu verstehen, wie die Verteilung der Rezeptoren DNAM-1, TIGIT und CD96 auf NK-Zellen im Allgemeinen ist und wovon sie abhängt. Es gibt Hinweise darauf, dass die Verteilung vom Aktivierungszustand der NK-Zelle abhängt. Während DNAM-1 auf NK-Zellen im „steady state“ in geringen Mengen ständig exprimiert ist, werden TIGIT und CD96 – eventuell aufgrund ihrer höheren Affinität zum gemeinsamen Liganden CD155 - erst bei Interaktion mit ruhenden Antigen-präsentierenden Zellen hochreguliert [32]. Zellulärer Stress reguliert wiederum den Liganden CD155 hoch, was zu einer verstärkten Aktivierung mittels DNAM-1 führt [32].

4.3 IL-12 steigert nicht die Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber SK-ES-1 und TC-71 Tumorzelllinien

Wir konnten im Caspase-Assay nachweisen, dass die funktionierende Einleitung einer Zellyse (veranschaulicht durch die Anzahl Caspase-3⁺ Tumorzellen) durch NK-Zellen zum großen Teil von DNAM-1 abhing. Die Blockierung von DNAM-1 mittels Antikörper führte zu einer starken Verminderung der Zytotoxizität (Abb. 17B, mittlere Reihe), welche auch durch Zugabe von IL-12 nicht wieder hergestellt werden konnte.

Die Blockade von CD96 in den NK-Zellen führte weder zu einer gesteigerten Tumorzellyse noch zu einem relevanten Zytotoxizitätsverlust der NK-Zellen. Über die Funktion von CD96 ist noch nicht so viel bekannt wie über die Funktion von TIGIT und DNAM-1. Es gibt sowohl Hinweise dafür, dass CD96 eine kostimulierende Aktivität besitzt [13], als auch dass es inhibierend wirkt, indem es um den gleichen Liganden mit DNAM-1 konkurriert und eine inhibierende intrazelluläre Domäne enthält (ITIM) [14]. Chan *et al.* (2014) konnten nachweisen, dass die NK-Zellen von CD96^{-/-} Mäusen, wesentlich aktiver waren und dadurch stärker auf Antigene reagierten und resistenter gegen einige Tumore waren [14]. Daher könnte man annehmen, dass eine Blockierung von CD96 zu einer Steigerung der Zytotoxizität in unserem Versuch führen sollte. Diese Annahme konnten wir allerdings nicht bestätigen. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Blockade von CD96 durch ein anderes inhibierendes Signal (z.B. TIGIT) kompensiert wird. TIGIT konkurriert schließlich mit CD96 und DNAM-1 um den gleichen Liganden CD155.

Fällt CD96 aus, sind mehr Bindungsstellen für DNAM-1 und TIGIT frei und TIGIT besitzt zudem von den dreien die höchste Affinität zu CD155. Leider stand uns ein blockierender Antikörper gegen TIGIT nicht zur Verfügung, sodass wir die Auswirkungen einer Blockade von TIGIT nicht überprüfen konnten.

Wie ist es allerdings zu erklären, dass wir durch IL-12 wenig bis keine Unterschiede in der zytotoxischen Aktivität der NK-Zellen feststellen konnten?

Die beobachtete Hochregulation von DNAM-1 unter IL-12 führte im Caspase-Assay nicht zur erwarteten gesteigerten Zytotoxizität. In unseren Ergebnissen blieb die Zytotoxizität gleich oder sank sogar. Außer DNAM-1 wurde keiner der anderen untersuchten, zytotoxizitäts-steigernden Rezeptoren (CD314, NCR) durch IL-12 positiv beeinflusst. In der CD56^{dim}-Population ist sogar ein signifikanter Abfall der Expression von CD314 zu sehen (Abb. 13). IL-12 stimuliert hingegen wie zuvor bereits erwähnt (s. 4.1) auch die Expression von inhibierend wirkenden Rezeptoren wie z.B. CD161. Zudem wird das Verhältnis der NK-Subpopulationen durch IL-12 zugunsten der weniger zytotoxischen CD56^{bright}CD16⁻ Population verschoben. Es ist daher naheliegend anzunehmen, dass die durch IL-12 hochregulierten aktivierenden und inhibierenden Signale sich in ihrer Wirkung gegenseitig aufheben und es daher im Caspase-Assay nicht zu einer sichtbar gesteigerten Zelllyse kommt.

Es ist zusätzlich wichtig zu erwähnen, dass offenbar auch die Kombination der Zytokine einen Einfluss auf die Wirkung von IL-12 hat. So konnten Wang *et al.* (2000) zeigen, dass die – in unseren Versuchen gewählte - kombinierte Gabe von IL-2 + IL-12 hinsichtlich der Zytotoxizität der NK-Zellen nicht zu einem synergistischen Effekt führen, sondern sich anscheinend antagonisieren [23]. Dies erscheint zunächst widersprüchlich, da IL-2 alleine die Sensitivität der NK-Zellen für IL-12 durch die Hochregulation von IL-12-Rezeptoren und STAT4, einem wichtigen Protein in der Signaltransduktion von IL-12, steigert. Bei zeitgleicher Inkubation von IL-2 + IL-12 zeigt sich dagegen im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation mit IL-2 eine reduzierte Expression von IL-12-Rezeptoren und STAT-Proteinen. Außerdem zeigt sich eine geringere zytotoxische Aktivität bei den NK-Zellen, die im Medium mit IL-2 + IL-12 inkubiert wurden. Wurden die Zellen allerdings mit IL-2 vorbehandelt, welches darauf ausgewaschen wurde, und darauffolgend

für kurze Zeit mit IL-12 stimuliert, bewirkte diese Kombination eine zusätzliche Steigerung der zytotoxischen Aktivität [23].

Da wir in unseren Versuchen IL-2 bzw. IL-15 nicht ausgewaschen haben, bevor wir die Zellen mit IL-12 stimulierten, könnte hier der Grund für die von uns nicht beobachtete gesteigerte zytotoxische Aktivität durch IL-12 liegen. Um diese Annahme zu überprüfen, müsste eine erneute Versuchsreihe im Caspase-Assay anhand des Zytokin-Schemas von Wang *et al.* durchgeführt werden.

Letztlich ist die Aktivierung der NK-Population, welche eine heterogene Gruppe bestehend aus mehreren Subpopulationen ist, ein Zusammenspiel mehrerer Signale von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass IL-12 die Balance zwischen Aktivierung und Inhibierung weder eindeutig in die eine noch in die andere Richtung verschiebt.

4.4 Problem-Management in der Zellkultur und beim FACS

Es soll ebenfalls Teil dieser Arbeit sein, die Probleme, auf die wir während der Arbeit in der Zellkultur und bei den Messungen am FACS gestoßen sind, zu erörtern und nach Lösungsansätzen zu suchen.

4.4.1 Aufreinigung und Kultivierung

Für die Versuche wurden die NK-Zellen mittels magnetischen Beads aus der großen Population von PBMCs aufgereinigt und es waren am Tag der Aufreinigung keine CD3⁺ Zellen im Durchfluss mehr nachweisbar. Nach 48h/7 Tagen waren allerdings wieder ca. 10% CD3⁺ zu finden (Abb. 18). Es gibt mehrere mögliche Erklärungen dafür, wieso wir diese Zellen am Tag der Aufreinigung nicht gesehen haben:

Möglicherweise waren die CD3⁺ Zellen am Anfang noch durch die CD3-Beads maskiert und wurden erst anfärbbar, als die Beads sich nach einiger Zeit von den Zellen gelöst haben. Allerdings würde das auch bedeuten, dass die Magnetsäulen nicht alle Beads binden konnten, was wiederum durch eine zu hohe Beladung der Säulen geschehen kann.

Als weitere mögliche Erklärung kommt die rasche Proliferation kontaminierender T-Zellen unter IL-2 Inkubation in Frage.

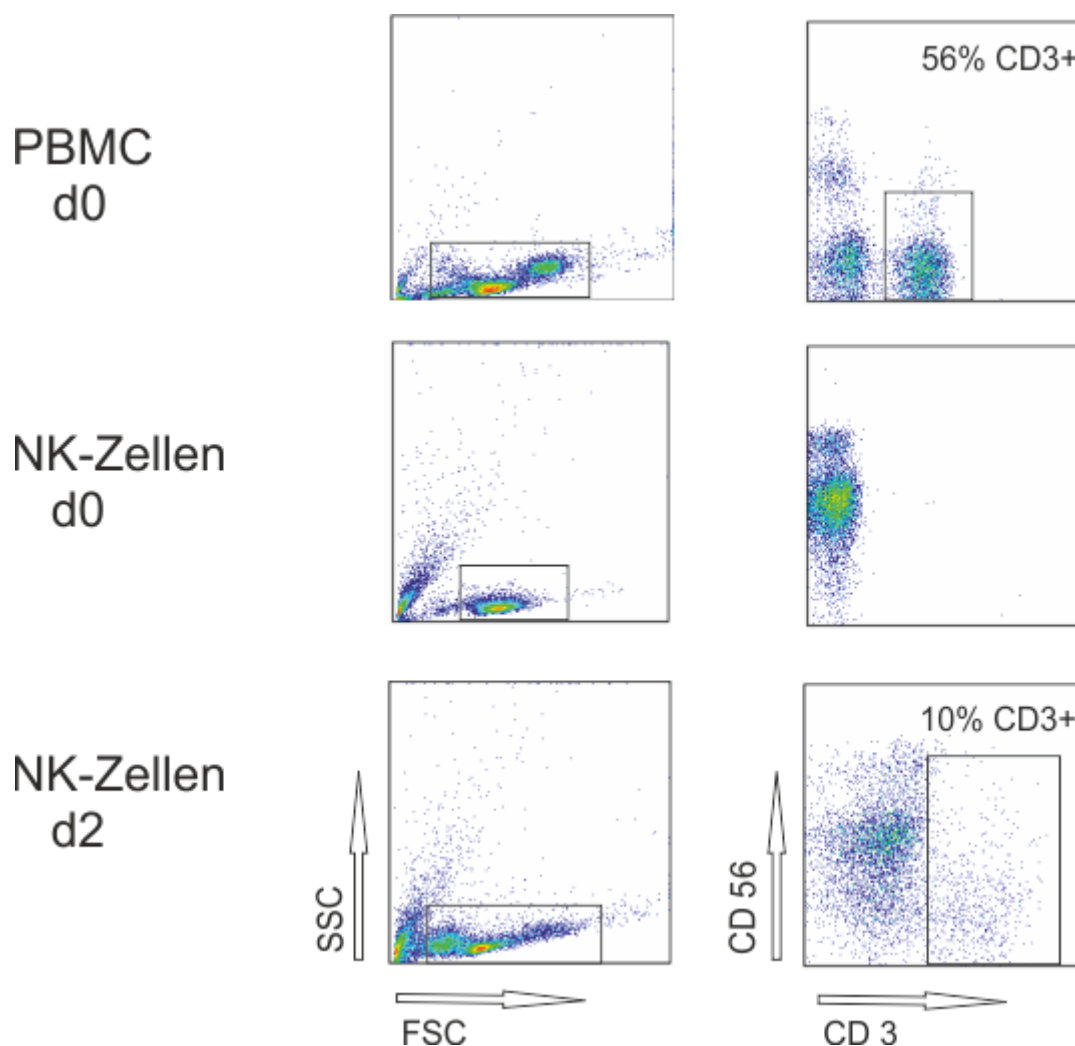


Abb. 18: Aufreinigung von NK-Zellen vor dem Caspase-Assay

Die NK-Zellen wurden nach dem in 2.2.3 beschriebenen Schema aus PBMCs aufgereinigt und für 48h mit Zytokinen inkubiert (dargestellt IL-2). Bei der Messung des Phänotyps (parallel zum Caspase Assay) sind wieder mehr CD3+- Zellen im FACS zu erkennen. Anmerkung: es wurden unterschiedliche Fluorochrome für CD-3 benutzt (obere und mittlere Reihe: Pacific blue; Untere Reihe: APC e Fluor780)!

Bei der relativ kleinen $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ NK Subpopulation waren die Ergebnisse der Aufreinigung im FACS zunächst ebenfalls nicht eindeutig. So entstand der Eindruck, dass die Aufreinigung nicht gänzlich funktioniert habe, da wir nach der Aufreinigung Zellen mit höherer und niedriger Fluoreszenz von CD16 beobachten konnten (Abb. 2C, untere Reihe, rechter Dot Plot). Vergleicht man allerdings die Aufreinigungen mit denen der $CD56^{\text{dim}}CD16^+$ NK Subpopulation (Abb. 2B und C, senkrechte Linie durch die Dot Plots der rechten Reihe), erkennt man, dass selbst die Zellen mit höherer Fluoreszenz von

CD16, als CD16^{dim} zu werten sind, da sie nicht in dem Bereich der wirklich CD16-positiven Zellen liegen (Abb. 2B, untere Reihe, rechter Dot Plot). Ein weiteres Problem stellte die Kultivierung der NK Subpopulationen über einen Zeitraum von mehreren Tagen dar. Die geringe Menge der aufgereinigten CD56^{bright} Subpopulation überlebten keine 7 Tage in Zellkultur trotz Stimulation mittels IL-2/IL-15. Daher mussten wir die Versuche mit diesen Zellen entsprechend anpassen. Loza *et al.* (2004), die den gleichen Effekt beschrieben, fanden als mögliche Erklärung der kurzen Überlebenszeit isolierter CD56^{bright} NK-Subpopulationen heraus, dass die verschiedenen Subpopulationen anscheinend den Kontakt miteinander benötigen, um zu überleben, wenn sie *in vitro* mit IL-12 kultiviert werden [30].

4.5 Ausblick

4.5.1 NK-Zellen in der Immuntherapie

Seit einiger Zeit wird neben der konventionellen Radio- und Chemotherapie das Potential von Immuntherapien in der Onkologie erforscht mit der Zielvorstellung eine möglichst effektive, aber gleichzeitig nebenwirkungsarme Therapie zu finden. Während es mit der Verstärkung von humoraler und T-Zell-vermittelter Immunität gegenüber verschiedenen Tumoren durch Checkpoint-Inhibitoren wie CTLA4- oder PD1-Inhibitoren bereits erste praxisreife Optionen der Immuntherapie gibt, sind die Möglichkeiten von NK-Zellen zur therapeutischen Nutzung noch weitgehend unbekannt. Dabei besitzen NK-Zellen den Vorteil einer Antigen-unabhängigen Immunität gegenüber maligne entarteten Zellen.

Es laufen daher mehrere klinische NK-Zell-Studien mit unterschiedlichen Ansätzen [33]. Dabei wird u.a. die Wirksamkeit der *ex vivo* Kultivierung, gefolgt von der Proliferation und Stimulation von - in der Regel allogenen - NK-Zellen mittels Zytokinen (IL-2, IL-12, IL-15) untersucht [34]. Die Auswahl bzw. Modulation der Zytokine (v.a. IL-2) ist hierbei maßgebend für eine erfolgreiche Stimulation der NK-Zellen ohne dabei gleichzeitig Immunmodulatorische Zellen wie regulatorische T-Zellen mit zu stimulieren, welche einen inhibitorischen Einfluss auf die NK-Zell-Aktivität haben [35].

Ein anderer Ansatz verfolgt die Verstärkung der Aktivität von NK-Zellen *in vivo* mittels immunmodulatorischer Medikamente (Lenalidomide) [36, 37]. Zudem wird auch der Nutzen von Checkpoint-Inhibitoren (PD1-mAk, KIR-mAk) untersucht. Die *in vitro* Studien deuten darauf hin, dass PD1-Checkpoint-Inhibitoren die Tumor-Reaktivität von NK-Zellen deutlich steigern können [38]. KIR-mAK zeigen zusammen mit Lenalidomiden eine Verstärkung der tumorgerichteten NK-Zell-Antwort [39].

Weitere Studien zielen auf die Sensibilisierung von Tumorzellen mittels Proteasom-Inhibitoren (Bortezomib) gegenüber dem Todesrezeptor TRAIL auf NK-Zellen ab [40].

Die Ergebnisse der präklinischen Studien weisen darauf hin, dass eine möglichst effektive Therapie am wahrscheinlichsten mittels einer Kombination der einzelnen Strategien gelingen könnte. So könnte beispielsweise die Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) von NK-Zellen enorm gesteigert werden durch die Kombination von mAK gegen Checkpoint-Inhibitoren oder inhibierende Rezeptoren (KIR, TIGIT) mit der Applikation von IL-12 und IL-2, wodurch die NK-Zellen expandieren und CD16 hochreguliert wird [41].

Vielversprechend sind auch die Ansätze analog zu der bereits erprobten CAR (Chimeric antigen receptor) T-Zell-Therapie eine CAR-NK-Zell-Therapie zu entwickeln [42, 43]. CAR-NK-Zellen weisen hier einige Vorteile gegenüber CAR-T-Zellen auf. So haben NK-Zellen im Gegensatz zu CAR-T-Zellen neben dem CAR-abhängigen Tötungsmechanismus noch weitere Möglichkeiten Tumorzellen zu eliminieren, welche auch dann noch greifen, wenn die Tumorzellen ihre CAR-Antigene im Sinne einer Immunevasion unterdrücken [44]. Zudem ist aufgrund des unterschiedlichen Zytokinrepertoires von NK-Zellen ein Zytokin-release-Syndrom durch proinflammatorische Zytokine - wie bei T-Zell-Therapien zu beobachten - weniger wahrscheinlich [44]. Des Weiteren besitzen CAR-NK-Zellen eine kürzere Lebensdauer als CAR-T-Zellen, was hinsichtlich des Nebenwirkungspotentials nach abgeschlossenem Anti-Tumor-Effekt von Vorteil ist [45].

4.5.2 Modulation der DNAM-1/TIGIT/CD96 - Achse

Ein weiteres wichtiges Werkzeug zur Beeinflussung von NK-Zellen und anderen Immunzellen ist die gezielte Modulation von inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren mittels monoklonaler Antikörper (mAK), welche wir für DNAM-1 und CD96 in unseren Versuchen ebenfalls verwendet haben.

Die Inhibition von CD96 hatte zwar keine positive Auswirkung auf die zytotoxische Aktivität der NK-Zellen gegenüber den getesteten Tumorzelllinien, jedoch konnte in Stu-

dien gezeigt werden, dass die Inhibition von CD96 mittels mAK das Wachstum von experimentellen Metastasen hemmt [46]. Zudem haben auch Chan *et al.* (2014) gezeigt, dass die Inhibition von CD96 die Aktivität der NK-Zellen steigert [14]. Neben CD96 stellt TIGIT, welches neben der Suppression von NK-Zellen und T-Effektorzellen auch in Verbindung steht mit einer erhöhten Suppression durch T_{reg}-Zellen, einen wichtigen Angriffspunkt für Therapien mit mAK dar [47]. In Kombination mit der Inhibition von immunologischen Checkpoint-Rezeptoren wie CTLA-4 und PD-1 kann die Wirkung hinsichtlich der Einschränkung des Tumorwachstums noch verstärkt werden [46, 47].

Neben der Entwicklung von mAK, die auf die direkte Inhibition von CD96 und TIGIT abzielen, ist die Beeinflussung der Bindung zum gleichen Liganden CD155 ebenfalls ein möglicher Ansatzpunkt. Die Stabilisierung der Bindung von DNAM-1 an CD155 könnte die Aktivität der NK-Zellen enorm steigern, da DNAM-1 die geringste Affinität zum Rezeptor hat [15].

Die Ergebnisse der Studien verdeutlichen, dass die Modulation der DNAM-1/TIGIT/CD96 – Achse einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Therapien darstellt.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von IL-12 auf die Rezeptoren DNAM-1, TIGIT und CD96 bei NK-Zellen näher zu untersuchen. Wir konnten nachweisen, dass IL-12 den Rezeptor DNAM-1 hochreguliert. CD96 wurde nach 48-stündiger Inkubation mit IL-12 bei frisch isolierten NK-Zellen zunächst ebenfalls hochreguliert, nach längerer *in vitro* Kultur mit IL-2/IL-15 und anschließender Intervention mit IL-12 für 48h fiel CD96 allerdings wieder unter das Ausgangsniveau ab. Zudem wurde nachgewiesen, dass eine bestimmte Inkubationszeit mit IL-12 (> 18h) für die beobachteten Veränderungen notwendig war. Die höchste Steigerung der Expression durch IL-12 konnte an den Rezeptoren CD62L (Adhäsion) und CD161 (Inhibition) beobachtet werden.

Die Ergebnisse wiesen im Weiteren darauf hin, dass IL-12 einen Einfluss auf das Verhältnis der NK-Subpopulationen besitzt, indem es durch Hochregulation von CD56 und Herabregulation von CD16 zu einer Umwandlung von CD56^{dim}CD16⁺ NK-Zellen zu CD56^{bright}CD16⁻ NK-Zellen beitrug. Die Subpopulationen reagierten zudem unterschiedlich auf IL-12. Während bei beiden Populationen DNAM-1 hochreguliert wurde, stieg die Expression von CD96 in der CD56^{dim} Population, fiel aber in der CD56^{bright} Population. Die Expression von TIGIT verhielt sich in der IL-15 Gruppe gegensätzlich dazu.

IFN- γ konnte die Expression der Liganden für DNAM-1, TIGIT und CD96 auf einer der untersuchten Tumorzelllinien (SK-ES-1) steigern. Die funktionellen Auswirkungen dieser Beobachtung konnten an dieser Stelle nicht überprüft werden, stellen aber einen interessanten Anknüpfungspunkt für weitere Experimente dar.

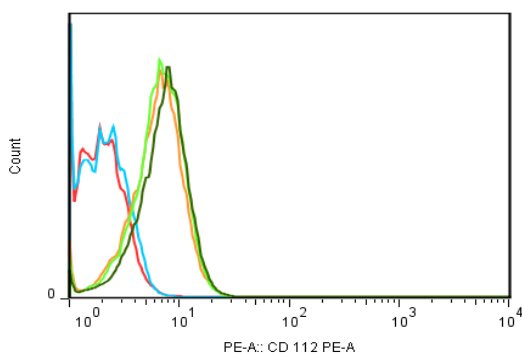
Die Zytotoxizität von NK-Zellen konnte nicht durch IL-12 gesteigert werden. Indessen konnten wir feststellen, dass DNAM-1 für die Aufrechterhaltung der zytotoxischen Funktion essentiell war und eine Blockierung von DNAM-1 zu einer drastischen Verringerung derselben geführt hat. Dagegen konnten die NK-Zellen ihre Funktion nach der Blockierung von CD96 weitestgehend aufrechterhalten, es kam allerdings auch nicht zu einer gesteigerten Lyse von Tumorzellen.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass IL-12 zwar die Expression von DNAM-1 auf NK-Zellen zu steigern vermochte, dies allerdings nicht zu einer gesteigerten Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den getesteten drei Tumorzelllinien geführt hat.

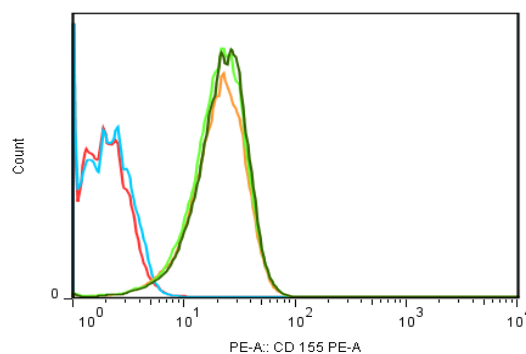
6 Anhang

Tabelle 6: Expression von CD112 und CD 155

Zelllinie	Herkunft	CD112		CD155	
		MFI	X-fold over isotype	MFI	X-fold over isotype
SK-ES-1	Ewing-Sarkom	81	19.5	66	17.8
SK-N-MC	Ewing-Sarkom	82	17.4	76	16.1
RD-ES	Ewing-Sarkom	209	54.6	163	42.6
TC71	Ewing-Sarkom	110	25.5	200	46
FM55	Melanom	32	5.6	248	43.5
T6217	Melanom	370	27	822	60



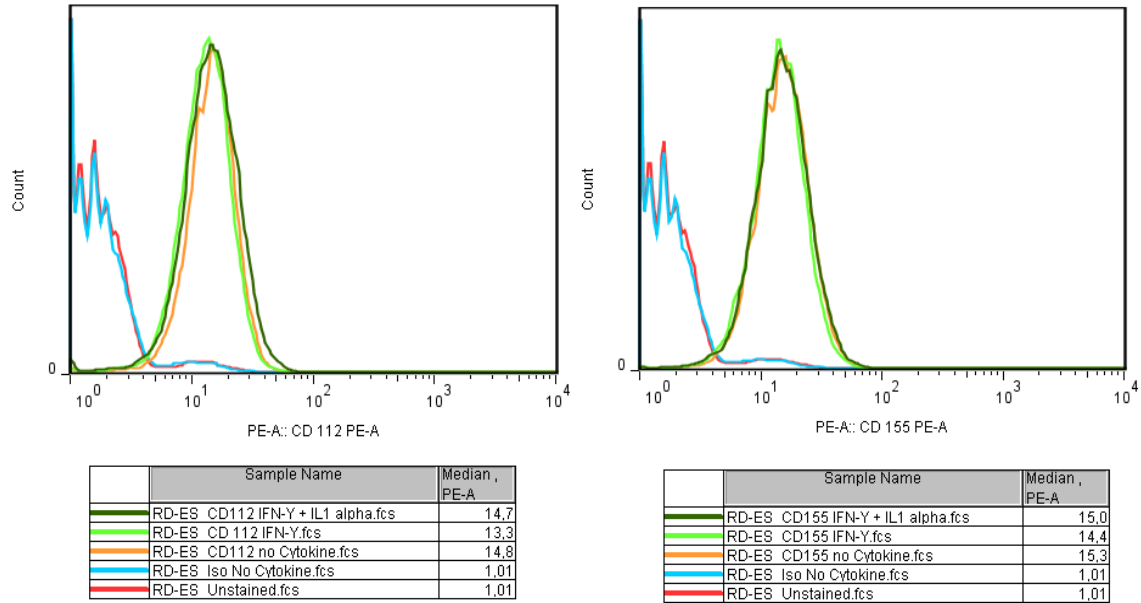
Sample Name	Median , PE-A
FM55_CD112_IFN-Y + IL1_alpha.fcs	7,49
FM55_CD 112_IFN-Y.fcs	6,84
FM55_CD112_no Cytokine.fcs	6,60
FM55_Iso No Cytokine.fcs	1,30
FM55_Unstained.fcs	1,07



Sample Name	Median , PE-A
FM55_CD155_IFN-Y + IL1_alpha.fcs	22,7
FM55_CD155_IFN-Y.fcs	21,6
FM55_CD155_no Cytokine.fcs	21,4
FM55_Iso No Cytokine.fcs	1,30
FM55_Unstained.fcs	1,07

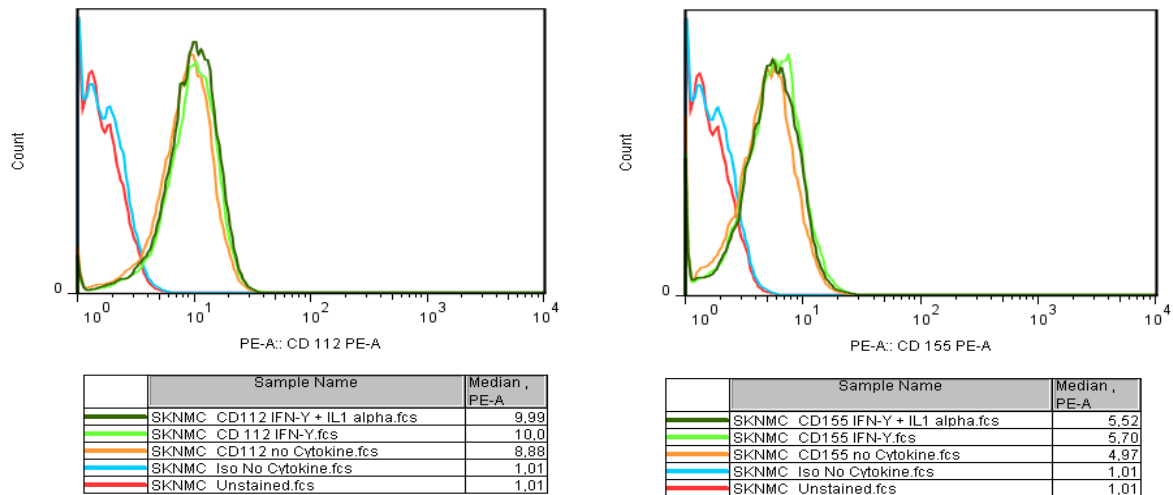
Ergänzende Abb. 1: Expression von CD112 und CD155 nach Stimulation mit IFN- γ \pm IL-1 α auf FM55 Tumorzellen

Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis. Die Versuche wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.



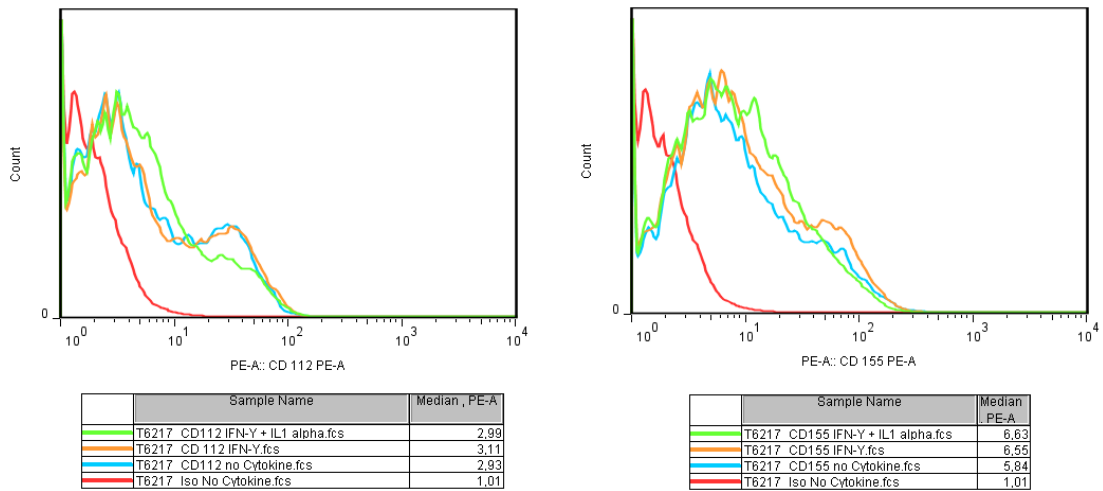
Ergänzende Abb. 2: Expression von CD112 und CD155 nach Stimulation mit IFN- γ \pm IL-1 α auf RD-ES Tumorzellen

Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis. Die Versuche wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.



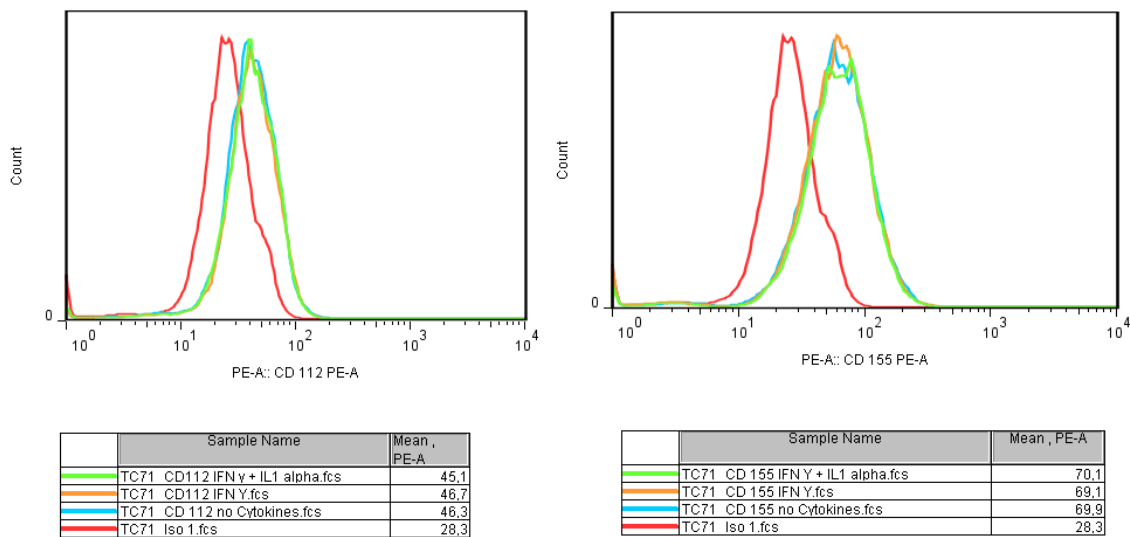
Ergänzende Abb. 3: Expression von CD112 und CD155 nach Stimulation mit IFN- γ \pm IL-1 α auf SK-NM-C Tumorzellen

Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis. Die Versuche wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.



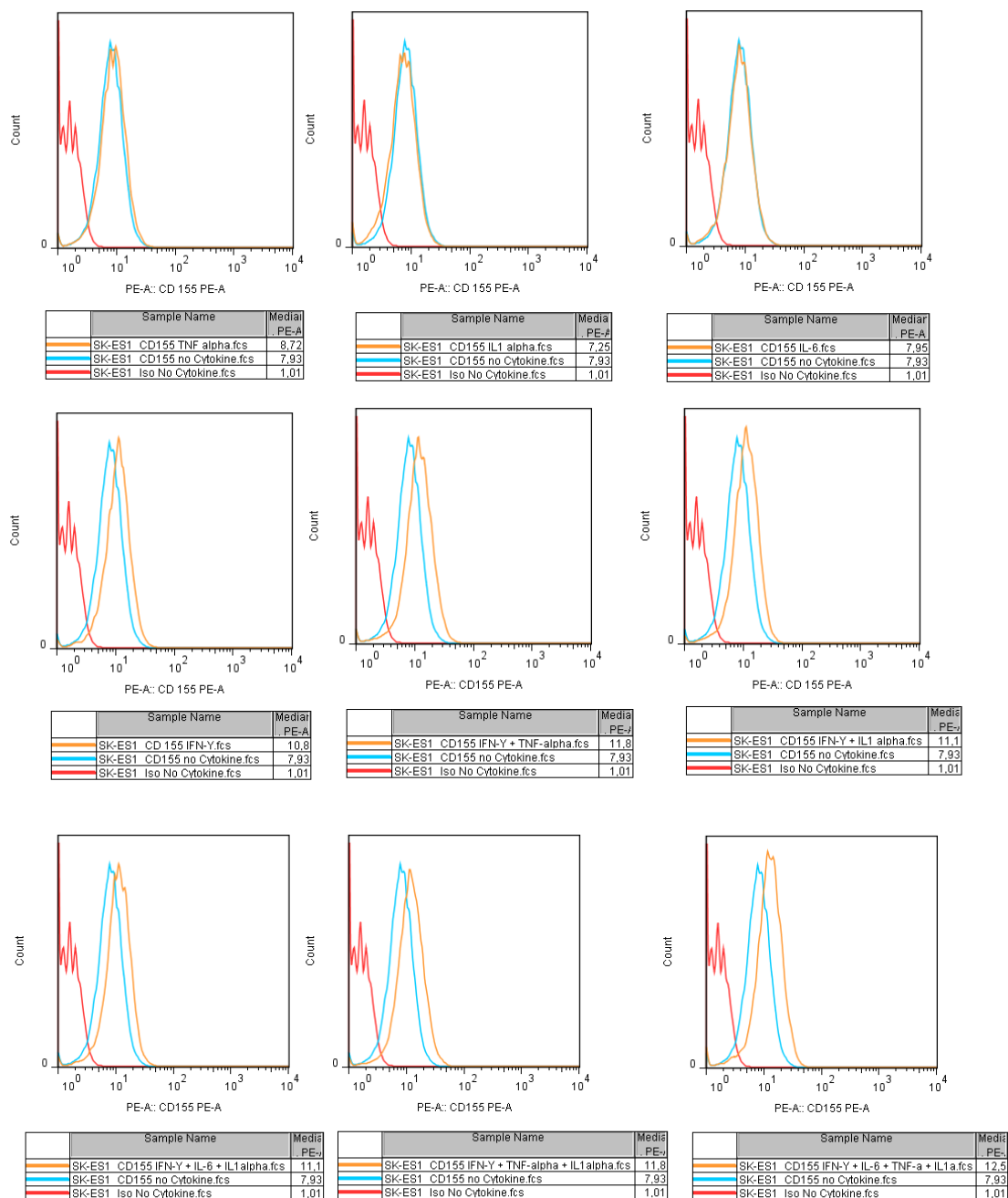
Ergänzende Abb. 4: Expression von CD112 und CD155 nach Stimulation mit IFN- γ \pm IL-1 α auf T6217 Tumorzellen

Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis. Die Versuche wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.



Ergänzende Abb. 5: Expression von CD112 und CD155 nach Stimulation mit IFN- γ \pm IL-1 α auf TC71 Tumorzellen

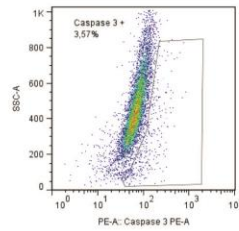
Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis. Die Versuche wurden wie in Abb. 15 beschrieben durchgeführt.



Ergänzende Abb. 6: Expression von CD112 und CD155 auf SK-ES1 nach Stimulation mit vier verschiedenen Zytokinen

Gezeigt ist ein beispielhaftes Ergebnis. Die Zytokine wurden in folgenden Mengen eingesetzt: IFN- γ (100ng/ml), IL1- α (10ng/ml), IL-6 (50ng/ml) und TNF- α (100ng/ml). Es wurden die folgenden Kombinationen getestet: Obere Reihe (von links nach rechts): TNF- α ; IL-1 α ; IL-6. Mittlere Reihe: IFN- γ ; IFN- γ + TNF- α ; IFN- γ + IL-1 α . Untere Reihe: IFN- γ + IL-1 α + IL-6; IFN- γ + TNF- α + IL-1 α ; IFN- γ + IL-1 α + IL-6 + TNF- α .

Spontan-Apoptose

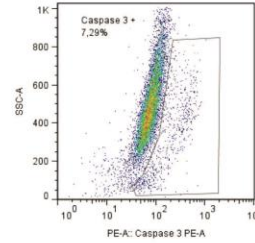
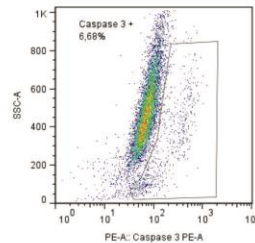
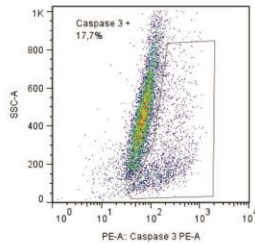


ohne AK

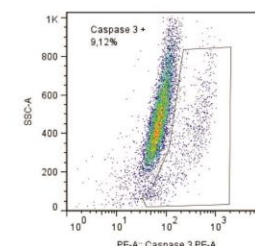
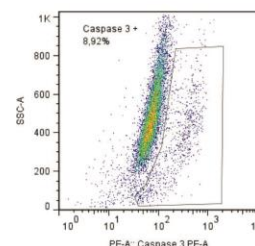
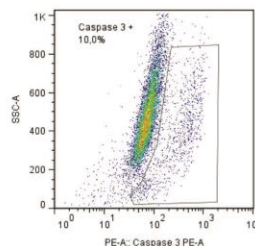
DNAM-1 AK

CD96-AK

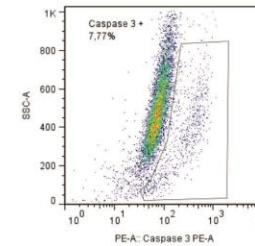
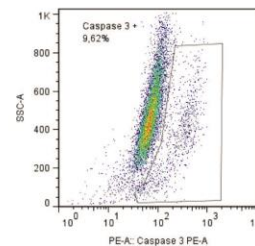
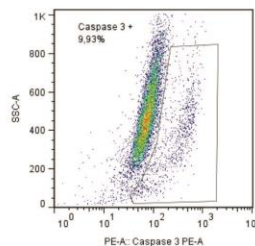
IL-2



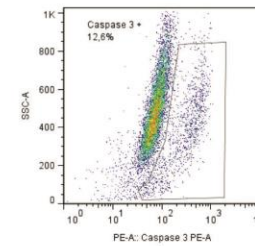
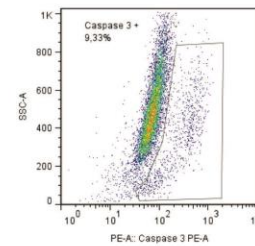
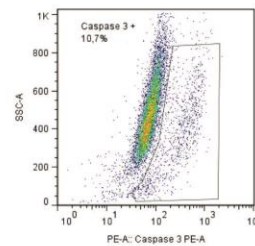
IL-2 + IL-12



IL-15



IL-15 + IL-12



Ergänzende Abb. 7: Caspase-Assay von FM55 Tumorzellen

Die Gating Strategie erfolgte analog zu den anderen zwei getesteten Tumorzelllinien (s. Abb 11A). Gezeigt ist die Auswertung eines von zwei Experimenten mit FM55 Zellen. Der Anteil spontan apoptotischer Zellen lag bei 3,57%. Nach Inkubation mit NK-Zellen stieg dieser Anteil auf ca. 10% (genaue Zahlen siehe Abbildungen). Y-Achse: SSC; X-Achse: Caspase 3.

7 Literaturverzeichnis

1. Karre, K., *Natural killer cell recognition of missing self*. Nat Immunol, 2008. **9**(5): p. 477-80.
2. Caligiuri, M.A., *Human natural killer cells*. Blood, 2008. **112**(3): p. 461-9.
3. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity*. Blood, 2003. **101**(8): p. 3052-7.
4. Chan, A., et al., *CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 89-94.
5. Farag, S.S. and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development and biology*. Blood Rev, 2006. **20**(3): p. 123-37.
6. Shibuya, A., et al., *DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes*. Immunity, 1996. **4**(6): p. 573-81.
7. Yu, X., et al., *The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells*. Nat Immunol, 2009. **10**(1): p. 48-57.
8. Boles, K.S., et al., *A novel molecular interaction for the adhesion of follicular CD4 T cells to follicular DC*. Eur J Immunol, 2009. **39**(3): p. 695-703.
9. Wang, P.L., et al., *Identification and molecular cloning of tactile. A novel human T cell activation antigen that is a member of the Ig gene superfamily*. J Immunol, 1992. **148**(8): p. 2600-8.
10. Bottino, C., et al., *Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule*. J Exp Med, 2003. **198**(4): p. 557-67.
11. Lakshmikanth, T., et al., *NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo*. J Clin Invest, 2009. **119**(5): p. 1251-63.
12. Stanietsky, N., et al., *The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(42): p. 17858-63.
13. Fuchs, A., et al., *Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155)*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 3994-8.
14. Chan, C.J., et al., *The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions*. Nat Immunol, 2014. **15**(5): p. 431-8.

15. Stanietsky, N. and O. Mandelboim, *Paired NK cell receptors controlling NK cytotoxicity*. FEBS Lett, 2010. **584**(24): p. 4895-900.
16. Vivier, E., et al., *Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells*. Science, 2011. **331**(6013): p. 44-9.
17. Kobayashi, M., et al., *Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes*. J Exp Med, 1989. **170**(3): p. 827-45.
18. Trinchieri, G., *Immunobiology of interleukin-12*. Immunol Res, 1998. **17**(1-2): p. 269-78.
19. Chehimi, J., et al., *Natural killer (NK) cell stimulatory factor increases the cytotoxic activity of NK cells from both healthy donors and human immunodeficiency virus-infected patients*. J Exp Med, 1992. **175**(3): p. 789-96.
20. Braun, M., et al., *IL12-mediated sensitizing of T-cell receptor-dependent and -independent tumor cell killing*. Oncoimmunology, 2016. **5**(7): p. e1188245.
21. de Andrade, L.F., M.J. Smyth, and L. Martinet, *DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(3): p. 237-44.
22. Verhoeven, D.H., et al., *NK cells recognize and lyse Ewing sarcoma cells through NKG2D and DNAM-1 receptor dependent pathways*. Mol Immunol, 2008. **45**(15): p. 3917-25.
23. Wang, K.S., D.A. Frank, and J. Ritz, *Interleukin-2 enhances the response of natural killer cells to interleukin-12 through up-regulation of the interleukin-12 receptor and STAT4*. Blood, 2000. **95**(10): p. 3183-90.
24. Juelke, K., et al., *CD62L expression identifies a unique subset of polyfunctional CD56dim NK cells*. Blood, 2010. **116**(8): p. 1299-307.
25. Raulet, D.H., et al., *Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor*. Annu Rev Immunol, 2013. **31**: p. 413-41.
26. Rosen, D.B., et al., *Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7796-9.
27. Aldemir, H., et al., *Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 7791-5.
28. Lanier, L.L., et al., *Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule*. J Exp Med, 1989. **169**(6): p. 2233-8.
29. Escalante, N.K., et al., *CD155 on human vascular endothelial cells attenuates the acquisition of effector functions in CD8 T cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2011. **31**(5): p. 1177-84.
30. Loza, M.J. and B. Perussia, *The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions*. J Immunol, 2004. **172**(1): p. 88-96.
31. Freud, A.G., J. Yu, and M.A. Caligiuri, *Human natural killer cell development in secondary lymphoid tissues*. Semin Immunol, 2014. **26**(2): p. 132-7.

32. Martinet, L. and M.J. Smyth, *Balancing natural killer cell activation through paired receptors*. Nat Rev Immunol, 2015. **15**(4): p. 243-54.
33. Childs, R.W. and M. Carlsten, *Therapeutic approaches to enhance natural killer cell cytotoxicity against cancer: the force awakens*. Nat Rev Drug Discov, 2015. **14**(7): p. 487-98.
34. Miller, J.S., et al., *Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3051-7.
35. Levin, A.M., et al., *Exploiting a natural conformational switch to engineer an interleukin-2 'superkine'*. Nature, 2012. **484**(7395): p. 529-33.
36. Zhu, D., et al., *Immunomodulatory drugs Revlimid (lenalidomide) and CC-4047 induce apoptosis of both hematological and solid tumor cells through NK cell activation*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(12): p. 1849-59.
37. Davies, F.E., et al., *Thalidomide and immunomodulatory derivatives augment natural killer cell cytotoxicity in multiple myeloma*. Blood, 2001. **98**(1): p. 210-6.
38. Benson, D.M., Jr., et al., *The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody*. Blood, 2010. **116**(13): p. 2286-94.
39. Benson, D.M., Jr., et al., *IPH2101, a novel anti-inhibitory KIR antibody, and lenalidomide combine to enhance the natural killer cell versus multiple myeloma effect*. Blood, 2011. **118**(24): p. 6387-91.
40. Lundqvist, A., et al., *Bortezomib treatment and regulatory T-cell depletion enhance the antitumor effects of adoptively infused NK cells*. Blood, 2009. **113**(24): p. 6120-7.
41. Souza-Fonseca-Guimaraes, F., *NK cell-based immunotherapies: awakening the innate anti-cancer response*. Discov Med, 2016. **21**(115): p. 197-203.
42. Wang, L., et al., *Chimeric antigen receptor (CAR)-modified NK cells against cancer: Opportunities and challenges*. Int Immunopharmacol, 2019. **74**: p. 105695.
43. Chang, Y.H., et al., *A chimeric receptor with NKG2D specificity enhances natural killer cell activation and killing of tumor cells*. Cancer Res, 2013. **73**(6): p. 1777-86.
44. Klingemann, H., *Are natural killer cells superior CAR drivers?* Oncoimmunology, 2014. **3**: p. e28147.
45. Brehm, C., et al., *IL-2 stimulated but not unstimulated NK cells induce selective disappearance of peripheral blood cells: concomitant results to a phase I/II study*. PLoS One, 2011. **6**(11): p. e27351.
46. Blake, S.J., et al., *Suppression of Metastases Using a New Lymphocyte Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy*. Cancer Discov, 2016. **6**(4): p. 446-59.

47. Blake, S.J., et al., *Molecular Pathways: Targeting CD96 and TIGIT for Cancer Immunotherapy*. Clin Cancer Res, 2016. **22**(21): p. 5183-5188.

Danksagung

Mein Dank gilt vor allem meiner wunderbaren Arbeitsgruppe! Die Atmosphäre hat mir von Anfang an gefallen und ich habe mich gleich wohl bei euch gefühlt. Besonders möchte ich unserer MTA Marie danken für ihr offenes Ohr und ihre Hilfsbereitschaft! Vielen Dank, dass du mir mit großer Geduld alles gezeigt hast!

Natürlich gilt mein Dank auch meinem Doktorvater Matthias. Deine ruhige und freundliche Art haben mir die Sicherheit gegeben, mich mit allen Fragen an dich wenden zu können. Für die Betreuung deiner Doktoranten nimmst du dir viel Zeit und versuchst zusammen zu Lösungen für die vielen Probleme im Labor zu kommen. Dein Wissen über das FACS ist beeindruckend und ebenso deine Geduld, wenn du uns wieder einmal die Grundlagen dieses Verfahrens näher brachtest😊. Ich danke auch Matthias Braun, der immer wieder Anregungen in das Projekt hinein gebracht hat.

Ich habe viel gelernt bei euch in den Jahren und hoffe, ihr hattet genauso Spaß mit mir zu arbeiten wie ich mit euch!

Lebenslauf

Andrej Shahnian (Geburtsname: Nassir-Shahnian)

geboren: 01.08.1988 in Düsseldorf

Schulbildung:

1999 - 2008 Gymnasium, Hermann-Tast-Schule Husum
Allgemeine Hochschulreife (Abitur), Abschlussnote 1,0

1995 - 1999 Grundschule, Bürgerschule Husum

Studium:

04/2013 – 06/2019 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg und der Universität Hamburg
Abschlussnote Sehr Gut (1,50)

05/2018 – 04/2019 Praktisches Jahr:
1. Terial Chirurgie an der Asklepios Klinik Altona, Hamburg
2. Terial Innere Medizin an der Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
3. Terial Wahlfach Neurologie an der Asklepios Klinik Altona, Hamburg

10/2017 Hochschulwechsel an die Universität Hamburg zum Praktischen Jahr

Seit 11/2014 Doktorarbeit in der pädiatrischen Immunologie der Universität Würzburg (AG Wölfl), Titel: „Regulation of DNAM1, CD96 and TIGIT by IL-12 in Natural Killer (NK) Cells“

10/2010 – 07/2012 Studium der Biomedizin (B.Sc.) an der Julius-Maximilians-Universität
Würzburg am Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie; Thema
der Bachelor-Arbeit: „Requirement of Ark5 (NUAK1) during pharmacological
activation of AMPK“
Abschlussnote Sehr Gut (1,3)

seit 04/2010 Aufnahme in das Stipendienprogramm der Studienstiftung des
deutschen Volkes

Hamburg, den 05.11.2019