

Aus dem Institut Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Wirkung von c-Flip auf „Innate Lymphoid Cells“

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Rebecca Labrenz

aus Hannover

Magdeburg 2020

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Labrenz, Rebecca: Die Wirkung von c-Flip auf „Innate Lymphoid Cells“. – 2020. – 67 Bl., 15 Abb., 2 Tab.

Kurzreferat:

Bei „Innate lymphoid cells“ (ILCs) handelt es sich um eine heterogene Gruppe lymphoider Immunzellen, die zum angeborenen Immunsystem gehören. Sie modulieren die Gewebshomöostase in verschiedenen Organen und regulieren anti-mikrobielle Immunantworten. Programmierter Zelltod, auch Apoptose genannt, ist essentiell für die Entwicklung sowie die Funktion des Immunsystems. Ob und wie der extrinsische Apoptosesignalweg die Entwicklung bzw. die Funktion von ILCs reguliert, war zu Beginn der vorliegenden Dissertation nicht bekannt. Um diese Frage zu beantworten wurden $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäuse hergestellt, in denen das anti-apoptotische Protein c-Flip selektiv in $NKp46^+$ -ILCs fehlte. Die durchflusszytometrische Analyse der Immunzellpopulationen in verschiedenen Organen von $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen und NK^{WT} -Mäusen zeigte eine starke Reduktion der $NKp46^+$ -Zellen in $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen. Die Entwicklung von T- und B-Zellen bzw. myeloiden Zellen war im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen unbeeinträchtigt. Bei der $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Maus handelt es sich demnach um ein neues Modell, mit dessen Hilfe sich die Bedeutung von $NKp46^+$ -ILCs in Mäusen mit intaktem Immunsystem testen lässt.

Um den molekularen Mechanismus der c-Flip-abhängigen Entwicklung von $NKp46^+$ -ILCs zu studieren, wurde ein experimentelles System etabliert, mit dessen Hilfe sich Teile der ILC-Entwicklung *in vitro* nachvollziehen ließen. Innerhalb von 9 Tagen konnte die Entwicklung $NK1.1^+NKp46^+$ -ILCs aus $NK1.1^-NKp46^-$ -ILC-Vorläuferzellen rekapituliert werden. Die Experimente zeigten, dass die Entwicklung von $NK^{\Delta c-FLIP} NK1.1^+NKp46^+$ -ILCs im Vergleich zu NK^{WT} -Kontrollen stark eingeschränkt war. Durch die Gabe eines Caspase-Inhibitors konnte dieser Entwicklungsdefekt teilweise kompensiert werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass c-Flip hauptsächlich die Caspase-vermittelte Apoptose in ILC-Vorläufern inhibiert und dadurch die Differenzierung zu reifen $NKp46^+$ -ILC ermöglicht. Der Caspase 8-abhängige, extrinsische Weg der Apoptoseinduktion wird durch Signale von sogenannten „Todesrezeptoren“ ausgelöst. Der Einsatz blockierender Antikörper im Zellkulturmodell durchgeführt zeigte, dass c-Flip die TNF- α -vermittelte Apoptose in einem frühen Stadium der Reifung von $NKp46^+$ -ILCs inhibiert. Die Expression von c-Flip in $NKp46^+$ -ILC ist daher essentiell für die Entwicklung und Reifung dieser Zellen im Knochenmark.

Schlüsselwörter: Innate lymphoid cells (ILC), Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), c-Flip, Apoptose, Todesrezeptoren

Inhaltsverzeichnis

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung.....	2
2.1	Immunsystem im Überblick	2
2.2	Lymphoide Zellen der angeborenen Immunität	4
2.2.1	Einteilung und Funktion von ILCs.....	4
2.2.2	Lokalisation und Entwicklung von NKp46 ⁺ -ILCs	6
2.2.3	Die Rolle von IL-15 in der Entwicklung von NKp46 ⁺ -ILCs	9
2.3	Signalwege der Apoptose	9
2.3.1	Apoptose	9
2.3.2	Todesrezeptoren.....	10
2.3.3	Das Protein c-Flip	12
2.3.4	Apoptose in NKp46 ⁺ -ILCs.....	14
2.4	Zielstellung.....	15
3	Material und Methoden	16
3.1	Material	16
3.1.1	Ausrüstung.....	16
3.1.2	Software	16
3.1.3	Reagenzien.....	16
3.1.4	Antikörper und Microbeads.....	17
3.1.5	Mauslinien	18
3.1.6	PCR-Primer.....	19
3.1.7	Puffer, Lösungen, Nährmedien	19
3.2	Methoden.....	21
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	21
3.2.2	Zellbiologische Methoden	24
3.2.3	Zellkultur.....	27
3.2.4	Statistische Analyse.....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Analyse der Immunzellpopulationen in Blut, Milz, Leber und Knochenmark	29

4.1.1 Verlust von NK1.1 ⁺ NKp46 ⁺ -ILCs im Blut und in der Milz von NK ^{Δc-FLIP} -Mäusen	29
4.1.2 Verlust von NK1.1 ⁺ NKp46 ⁺ -ILCs in Leber und Knochenmark von NK ^{Δc-FLIP} -Mäusen	32
4.1.3 Einfluss des Verlusts von c-Flip in NK1.1 ⁺ NKp46 ⁺ -ILCs auf T- und B-Zellen	34
4.1.4 Auswirkungen des Verlusts von NK1.1 ⁺ NKp46 ⁺ -ILCs auf Zellen der myeloischen Linie	42
4.2 Einfluss der c-Flip-Inaktivierung auf die Entwicklung von NKp46 ⁺ -ILCs	44
4.2.1 Analyse der ILC-Vorläufer im Knochenmark von NK ^{Δc-FLIP} -Mäusen	44
4.2.2 Die Inaktivierung von c-Flip in NKp46 ⁺ -Vorläuferzellen führt zum Abbruch der ILC-Entwicklung <i>in vitro</i>	45
4.2.3 Inhibition der Caspase-abhängigen Apoptose in NKp46 ⁺ -ILC-Vorläufern	47
4.2.4 Blockade von Todesrezeptoren in NKp46 ⁺ -ILC-Vorläufern	49
5 Diskussion	51
5.1 Mit NK ^{Δc-FLIP} -Mäusen lässt sich die Bedeutung von c-Flip für die Bildung von NKp46 ⁺ -ILCs und deren Relevanz <i>in vivo</i> testen	51
5.2 c-Flip schützt NKp46 ⁺ -ILCs vor TNF-α-induzierter Apoptose	52
6 Zusammenfassung	55
7 Literaturverzeichnis	57
8 Danksagung	65
9 Ehrenerklärung	66
10 Darstellung des Bildungsweges	67

1 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (Antikörperabhängige Zytotoxizität)
BCR	B-Zellrezeptor
CD	Cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen)
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CLP	Common lymphoid progenitor (Gemeinsame lymphatische Vorläuferzelle)
DC	Dendritische Zelle
DD	Death domain (Todesdomäne)
DED	Death effector domain (Todeseffektordomäne)
FADD	Fas-associated death domain (Fas-assoziierte Todesdomäne)
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
IFN- α	Interferon- α
IFN- β	Interferon- β
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL-12	Interleukin-12
IL-13	Interleukin-13
IL-15	Interleukin-15
IL-17	Interleukin-17
IL-2	Interleukin-2
IL-21	Interleukin-21
IL-22	Interleukin-22
IL-4	Interleukin-4
IL-5	Interleukin-5
IL-7	Interleukin-7
IL-7R α	Interleukin-7 Rezeptor-Untereinheit α
IL-9	Interleukin-9
ILC	Innate lymphoid cell (innate lymphoide Zelle)
iNK	Unreife (immature) NK-Zelle
KIR	Killerzellen-Immunglobulinähnlicher Rezeptor
KLR	Killerzellen-Lektinähnlicher Rezeptor
mNK	Mature NK-Zelle
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
NCR	Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NKD	Natural killer cell deficiency (NK-Zell-Mangel)
NKP	NK Precursor (NK-Zellvorläufer)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard error of the mean (Standardfehler des Mittelwertes)
TCR	T-Zellrezeptor
TNFR1	TNF- Rezeptor 1
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor α
TRADD	TNFR-associated death domain (TNFR-assoziierte Todesdomäne)
TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand (TNF-ähnlicher Apoptose induzierender Ligand)
TRAILR	TRAIL-Rezeptor

2 Einleitung

2.1 Immunsystem im Überblick

Die vielfältigen Aufgaben und Herausforderungen, die der Alltag an unser Immunsystem stellt, bemerken wir oft kaum. Nicht mal im Rahmen von Infekten, Immundefizienzen oder Überreaktionen fällt dem Einzelnen auf, wie viele Vorgänge auf molekularer Ebene jeden Tag unbemerkt im menschlichen Körper stattfinden. Das Immunsystem dient zur Unterscheidung von Selbst und Fremd und schützt vor Mikroorganismen aus der Umwelt. Außerdem sind die Immunzellen verantwortlich für die Beseitigung von gealterten, geschädigten oder entarteten Zellen. Immunzellen kommen in den lymphatischen Geweben und Organen des Körpers vor. Außerdem finden sich zirkulierende Immunzellen im Blut sowie gewebsständige Immunzellen in Schleimhäuten, dem Mukosa-assoziierten lymphatischen Gewebe (MALT). Die immunologischen Organe unterteilt man in primäre lymphatische Organe, in denen die Immunzellen entstehen, und in sekundäre lymphatische Organe, in denen vorwiegend reife Immunzellen zu finden sind (Murphy et al. 2012).

Ein humoraler Teil des angeborenen Immunsystems ist das Komplementsystem. Es besteht aus verschiedenen Plasmaproteinen, die entweder direkt durch Antigen-Kontakt oder über pathogen-gebundene Antikörper aktiviert werden. Eine wesentliche Aufgabe des Komplementsystems ist die Opsonisierung. Dabei werden Pathogene mit Antikörpern oder Proteinen des Komplementsystems besetzt und somit die Phagozytose und Zerstörung der Erreger erleichtert. Ebenso tragen Komponenten des Komplementsystems dazu bei, Immunzellen zu rekrutieren, sie wirken vasoaktiv und entzündungsfördernd (Murphy et al. 2012).

Aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen entwickeln sich im Knochenmark Zellen der lymphatischen und myeloischen Linie. Die Vorläufer der myeloischen Zelllinie reifen zu Granulozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen sowie Thrombozyten und Erythrozyten. Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen (DCs) sind in der Lage, Pathogene und sonstiges Fremdmaterial zu phagozytieren. Makrophagen und DCs gehören zur Gruppe der professionellen Antigen-präsentierenden Zellen, die durch die Expression von MHC II-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wichtig für die Induktion der adaptiven Immunantwort sind. Granulozyten werden in neutrophile, basophile oder eosinophile Zellen unterteilt. Neueren Untersuchungen zufolge exprimieren auch neutrophile Granulozyten unter bestimmten Bedingungen MHC II-Moleküle (Vono et al. 2017). Mastzellen enthalten Histamin-haltige Granula und sind zum Beispiel bei der Abwehr von Parasiten entscheidend (Murphy et al. 2012).

Aus frühen Vorläuferzellen der lymphatischen Linie (common lymphoid precursor, CLP) entstehen in mehreren Stufen verschiedene lymphoide Zelltypen, die nach dem Verlassen

des Knochenmarks weitere Reifungsstufen durchlaufen. Hier werden T-Zellen, B-Zellen und *Innate lymphoid cells* (ILCs) unterschieden. T- und B-Zellen verfügen über Antigen-spezifische Rezeptoren. Diese ermöglichen das spezifische Erkennen von Antigenen. Die ILCs, eine heterogene Gruppe von angeborenen Immunzellen der lymphoiden Reihe, wurden erst vor wenigen Jahren näher beschrieben (Spits et al. 2013). Im Gegensatz zu T- und B-Zellen verfügen sie nicht über durch Genrekombination gebildete antigenspezifische Rezeptoren. Eine Untergruppe der ILCs, die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sezernieren nach Aktivierung Zytokine oder wirken zytotoxisch auf virusinfizierte oder transformierte Zellen (Vivier et al. 2008). Zu den Funktionen der ILCs gehören die unspezifische Abwehr von Mikroorganismen, der Schutz von epithelialen Barrieren und die Aufrechterhaltung der Gewebestruktur (Spits und Di Santo, James P. 2011). Charakteristisch für die ILCs ist die Abwesenheit von durch genetische Rekombination entstandenen, Antigen-spezifischen Rezeptoren im Gegensatz zu Zellen des adaptiven Immunsystems (Spits und Cupedo 2012). Die Zellen des adaptiven Immunsystems haben die Fähigkeit, durch membranständige Rezeptoren Antigene spezifisch zu erkennen. Bei den T-Zellen wird das Signal über den T-Zellrezeptor (TCR) empfangen, der mit dem Signalprotein-Komplex CD3 assoziiert ist. Funktionell werden die T-Zellen anhand der Expression von Korezeptoren in CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen differenziert. Weitere funktionelle Einteilungen werden anhand der Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren und der jeweils sezernierten Zytokinmuster vorgenommen (Unterteilung in T-Helfer-Zelltyp 1, 2, 17 und regulatorische T-Zellen (T_H1 , T_H2 , T_H17 und Treg)) (Murphy et al. 2012).

B-Zellen exprimieren membranständige Immunglobuline als B-Zellrezeptoren (BCR), die ebenfalls die spezifische Erkennung bestimmter Antigene ermöglichen. Dadurch erfolgt eine Aktivierung der B-Zelle, die in der Bildung von Antikörpern gegen dieses spezielle Antigen und die Differenzierung zur Plasmazelle mündet. Antikörper binden an Antigene auf den Pathogenen und ermöglichen so, dass die Erreger durch das Komplementsystem erkannt und durch Phagozytose unschädlich gemacht werden. Aufgrund ihrer Struktur und Funktion werden Antikörper in unterschiedliche Klassen unterteilt: Immunglobulin A (IgA), Immunglobulin D (IgD), Immunglobulin E (IgE), Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin M (IgM) (Murphy et al. 2012).

Zu den Besonderheiten des adaptiven Immunsystems zählt auch, dass dessen Zellen ein immunologisches Gedächtnis ausbilden. T- und B-Zellen können über die Antigen-spezifischen Rezeptoren Strukturen wie zum Beispiel Proteine, Polysaccharide und Glykoproteine identifizieren. Auf diese spezifische Erkennung von Antigenen reagieren T- und B-Zellen mit Gedächtnisbildung. Zellen, die bereits im Rahmen einer primären Immunantwort Kontakt mit einem bestimmten Antigen hatten, reagieren bei der sekundären Immunantwort schneller und effizienter auf ein spezifisches Antigen (Murphy et al. 2012).

2.2 Lymphoide Zellen der angeborenen Immunität

2.2.1 Einteilung und Funktion von ILCs

Die ILCs werden klassischerweise dem angeborenen Immunsystem zugeordnet, da sie nicht über durch somatische Rekombination gebildete, Antigen-spezifische Rezeptoren verfügen (Artis und Spits 2015). Sie werden in drei Hauptgruppen eingeteilt, die bezüglich der Transkriptionsfaktorenexpression und der sezernierten Zytokinmuster verschiedenen T-Zellsubpopulationen ähneln (Spits et al. 2013). Es sind T-Helferzellähnliche ILC1, 2 und 3 beschrieben. ILC1 benötigen in ihrer Entwicklung den Transkriptionsfaktor T-bet (Rankin et al. 2013) und produzieren vorwiegend Interferon- γ (IFN- γ). Damit gleichen sie dem Profil der T_H1-Zellen (Spits et al. 2013). ILC2 werden durch den Transkriptionsfaktor GATA-3 charakterisiert und produzieren die Interleukine-4 (IL-4), -5 (IL-5) und -13 (IL-13). Wie die T_H2-Zellen beeinflussen sie die Homöostase von eosinophilen Granulozyten. Daher modulieren ILC2 die Immunreaktion auf Wurminfektionen und spielen eine bedeutende Rolle bei Allergien (Spits et al. 2013; Nussbaum et al. 2013). Sowohl in den T_H17-Zellen als auch in den ILC3 wird der Transkriptionsfaktor ROR γ t zur Entwicklung benötigt. ILC3 sezernieren Interleukin-17 (IL-17) und Interleukin-22 (IL-22) (Spits et al. 2013). Besonders IL-22 spielt eine wichtige Rolle in der Schutzbarriere des intestinalen Epithels und Interaktion mit der kommensalen Darmflora (Sonnenberg und Artis 2012; Zenewicz et al. 2008). Durch die Produktion von IL-17 schützen sie die oropharyngeale Mucosa vor einer Pilzinfektion mit *Candida albicans* (Gladiator et al. 2013).

Die konventionellen NK-Zellen (NK-Zellen) sind mit ihrer Entdeckung 1975 (Kiessling et al. 1975) die am längsten bekannten ILCs und werden als Subpopulation den ILC1 zugeordnet (Spits et al. 2013; Artis und Spits 2015). Jedoch stellen NK-Zellen eine besondere Gruppe der ILC1 dar. Sie besitzen zytotoxische Eigenschaften und ähneln in dieser Hinsicht eher den CD8⁺-T-Zellen. Diese zytotoxische Effektor-Funktion unterscheidet sie von den anderen nicht-zytotoxischen ILC-Untergruppen (Artis und Spits 2015). Während der Immunantwort werden NK-Zellen früh durch Zytokine, insbesondere Interferone, aktiviert. Die Zytokine werden zum Beispiel als Botenstoffe von aktivierten Makrophagen oder DCs nach Antigen-Kontakt ausgeschüttet. Auch Nicht-Immunzellen produzieren Zytokine, die NK-Zellen beeinflussen. Besonders die Anwesenheit von Interferon- α (IFN- α), Interferon- β (IFN- β), IL-2, IL-12, IL-15 und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) stimuliert NK-Zellen (Murphy et al. 2012; Colucci et al. 2003).

NK-Zellen spielen eine essentielle Rolle bei der Erkennung und Abtötung von virusinfizierten und entarteten Zellen. Ihre zytotoxische Aktivität muss streng reguliert werden, um geschädigte Zellen zu eliminieren, jedoch gesundes Gewebe nicht zu zerstören. Aus diesem Grund wird die Aktivität von NK-Zellen durch ein dynamisches Gleichgewicht gesteuert, das

sich aus Signalen aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf der Oberfläche zusammensetzt (Vivier et al. 2008; Lanier 2008). Zu den inhibierenden Rezeptoren zählen beispielsweise die Killerzellen-Lektin-ähnlichen-Rezeptoren (KLR, in der Maus) und die Killerzellen-Immunglobulin-ähnlichen-Rezeptoren (KIR, beim Menschen). Zu den KLR gehört die Familie der Ly49-Rezeptoren. Diese erkennen spezifisch bestimmte MHC-Klasse-I-Moleküle auf körpereigenen Zellen. Bei Verlust der MHC-Klasse-I-Expression auf der Zelloberfläche (durch eine Virusinfektion, maligne Transformation oder andere Stressreaktion der Zelle) entfällt das inhibierende Signal und die zytotoxische Reaktion der NK-Zelle wird aktiviert (Vivier et al. 2008; Sun und Lanier 2011). Diese Selbsttoleranz von NK-Zellen führt dazu, dass gesunde körpereigene Zellen vor der zytotoxischen Aktivität der NK-Zelle geschützt sind. Voraussetzung für diese Selbsttoleranz der NK-Zellen sind Prozesse, die während der Entwicklung ablaufen und als Licensing oder Education bezeichnet werden. Abhängig von der Expression bestimmter Ly49-Rezeptoren erkennen einige NK-Zellen in ihrer Entwicklung (Licensing) den individuellen MHC-Klasse-I-Haplotyp und reagieren mit einem inhibitorischem Signal. Erst bei Wegfall dieses Signals werden verstärkt zytotoxische Mechanismen aktiviert (Kim et al. 2005).

Neben den inhibierenden Rezeptoren gibt es auch aktivierende Rezeptoren, z.B. natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR). In die Klasse der NCR gehören unter anderem NKp30, NKp44 und NKp46. NKp46 spielt eine Rolle bei der Erkennung von entarteten Zellen (Halfteck et al. 2009) und aktiviert die NK-Zellen nach Kontakt mit viralen Proteinen (Narni-Mancinelli et al. 2011; Mandelboim et al. 2001). Kürzlich wurde beschrieben, dass die Interaktion von NKp46 mit Komplementfaktor P (CFP) bei Mäusen entscheidend zum Überleben einer Infektion mit *Neisseria meningitidis* beiträgt (Narni-Mancinelli et al. 2017).

Nach Aktivierung sezernieren NK-Zellen in Granula gespeicherte Granzyme und Perforine, die die Lyse einer Zielzelle einleiten. Darüber hinaus sezernieren sie Zytokine wie IFN- γ , Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) und TNF- α und sind damit in die Aktivierung verschiedener Immunzellen sowie bei der Induktion inflammatorischer Reaktionen involviert (Colucci et al. 2003; Ljunggren und Malmberg 2007). Durch die Expression des Fc-Rezeptors CD16 können NK-Zellen zudem IgG-markierte Zellen erkennen und durch antikörpervermittelte Zytotoxizität (ADCC) zerstören (Vivier et al. 2008; Ljunggren und Malmberg 2007).

NK-Zellen sind für die Abwehr von Virusinfektionen essentiell. Klinisch ist zu beobachten, dass Patienten mit einem NK-Zell-Mangel-Syndrom (Natural killer cell deficiency =NKD) (Orange 2013) eine hohe Anfälligkeit für Herpesvirus-Infektionen haben. Ebenso ist im Mausmodell nachgewiesen, dass ein NK-Zellverlust Infektionen mit protozoischen Parasiten wie Leishmanien begünstigt (Murphy et al. 2012; Vivier et al. 2008). Zudem wurde in einer 11-jährigen klinischen Verlaufsstudie gezeigt, dass verminderte NK-Zellaktivität im

Blut langfristig mit einem erhöhten Tumorrisiko einhergeht (Imai et al. 2000). In verschiedenen Modellen konnte der protektive Einfluss von NK-Zellen gegen Tumorzellwachstum gezeigt werden. (Ljunggren und Malmberg 2007; Morvan und Lanier 2016; Halfteck et al. 2009). Daher werden verschiedene Therapieansätze, wie die Behandlung mit IL-2 zur Förderung der NK-Aktivität oder der adoptive NK-Zelltransfer in Tumorpatienten verfolgt (Morvan und Lanier 2016; Ljunggren und Malmberg 2007).

Die Unterscheidung von zytotoxischen und nicht-zytotoxischen ILCs ist nicht immer einfach, da viele der typischen NK-Zell-Rezeptoren wie NK1.1, NKp46, NKp44, NKG2D und Ly49 auch auf murinen Helferzellähnlichen-ILC1 und einigen murinen ILC3 vorkommen (Spits et al. 2016). Auf ILC2 und einigen ILC3 findet sich zum Beispiel nicht der Rezeptor NKp46 (Spits et al. 2013).

Der Einfluss von ILC1 auf intestinale Entzündungsreaktionen wird aktuell untersucht. Es wurde gezeigt, dass bei einer chronisch-entzündlich veränderter Darmschleimhaut wie beim Morbus Crohn deutlich mehr ILC1 in der intestinalen Mukosa akkumulieren (Bernink et al. 2013). Die Helferzellähnlichen-ILC1 werden unter anderem durch IL-12 und IL-15 zur Produktion von IFN- γ und TNF- α stimuliert (Fuchs et al. 2013; Artis und Spits 2015; Klose et al. 2014). Bekannt ist, dass eine Dysregulation der TNF- α -Produktion zur Pathogenese der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (CED) beiträgt (Levin et al. 2016). Bei Blockade von TNF- α verringert sich im Mausmodell einer Colitis ulcerosa die Bildung von kolorektalen Karzinomen (Popivanova et al. 2008). Bei bakteriellen Infektionen mit *Clostridium difficile* haben ILC1 hingegen eine protektive Wirkung (Abt et al. 2015). In ILC1-defizienten Mäusen kann sich eine Infektion mit dem Parasiten *Toxoplasma gondii* ungehindert ausbreiten, obwohl eine normale NK-Zellpopulation vorliegt (Klose et al. 2014). NK-Zellen und Helferzellähnliche-ILC1 haben ein ähnliches Zytokinprofil und sind unabkömmlich bei der Infektabwehr.

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf ILCs, die NKp46 exprimieren. Dazu gehören die NKp46⁺-ILC1 inklusive der Untergruppe der konventionellen NK-Zellen sowie NKp46⁺-ILC3.

2.2.2 Lokalisation und Entwicklung von NKp46⁺-ILCs

NKp46⁺-ILCs sind in unterschiedlichen lymphatischen und nicht-lymphatischen Organen zu finden, meist jedoch in geringer Anzahl. In der Milz, dem Blut und den peripheren Lymphknoten beträgt der Anteil der NK-Zellen ca. 1-3% der Immunzellen, wohingegen ihr Anteil in der Leber und Lunge bis zu 10% der Immunzellen ausmachen kann (Grégoire et al. 2007). Die nicht-zytotoxischen NKp46⁺-ILC1 und NKp46⁺-ILC3 sind als gewebständige Zellen in lymphatischen Organen (wie z.B. Milz oder peripheren Lymphknoten) und nicht-lymphatischen Organen (wie z.B. den Speicheldrüsen, der Lamina propria des Dünndarms, der Lunge und der Leber) zu finden (Gasteiger et al. 2015).

Der Hauptbildungsort der NKp46⁺-ILCs im adulten Tier ist das Knochenmark. Aus dem CLP, aus dem sich auch T- und B-Zellen entwickeln können, differenziert sich ein ILC-Vorläufer (Possot et al. 2011; Klose et al. 2014; Constantinides et al. 2014). Abhängig von der Expression des Transkriptions-regulierenden Proteins Id2 entwickelt sich daraus eine zytotoxische ILC oder nicht-zytotoxische ILC (Klose et al. 2014; Artis und Spits 2015). In Abwesenheit von Id2 und Fehlen des Transkriptionsfaktors GATA3 werden NK-Zellvorläufer (NKP) gebildet (Rosmaraki et al. 2001; Klose et al. 2014). Unter Id2- und GATA3-Einfluss entsteht ein Vorläufer der anderen T-Helferzell-ähnlichen Untergruppen (*Common Progenitor to All Helper-like ILC*, CHILP) (Klose et al. 2014).

NKP-Zellen exprimieren den Zytokinrezeptor CD122, (β -Kette des IL-2- und IL-15-Rezeptors) jedoch nicht die typischen NK-Zellmarker wie NK1.1, NKp46 und CD11b. (Yu et al. 2013; Rosmaraki et al. 2001). Die Expression von CD122 ermöglicht es der NK-Zelle, durch IL-2 und vor allem IL-15-Signale weiter zu reifen (Colucci et al. 2003). Die weitere Entwicklung des NK-Zellvorläufers ist durch die sukzessive Hochregulation verschiedener Oberflächenrezeptoren gekennzeichnet (Abb 2.1). NK1.1 wird auf der zunächst noch unreifen NK-Zelle (iNK) hochreguliert, gefolgt von NKp46 (Kim et al. 2002). Eine reife NK-Zelle zeichnet sich vor allem durch ihre zytotoxische Fähigkeit und die Produktion von IFN- γ aus (Yu et al. 2013; Huntington et al. 2007b). Die Entwicklung einer NK-Zelle ist eng verknüpft mit der Expression der Transkriptionsfaktoren Eomesodermin (Eomes) und T-bet (Gordon et al. 2012). Das Zusammenspiel dieser beiden Transkriptionsfaktoren wird ebenso bei CD8⁺-T-Zellen beschrieben (Pearce et al. 2003).

Auch die reife NK-Zelle (mNK) durchläuft weitere Differenzierungsstadien. Die verschiedenen Stadien lassen sich anhand der differentiellen Expression von CD27 und CD11b charakterisieren: von unreifen CD11b^{low}CD27^{low}-NK-Zellen über CD11b^{low}CD27⁺-NK-Zellen und über CD11b⁺CD27⁺-NK-Zellen bis zur reifen Form von CD11b⁺CD27^{low}-NK-Zellen (Chiossone et al. 2009). In den peripheren Organen werden je nach Aktivierung der mNK-Zellen verschiedene Oberflächenrezeptoren hochreguliert (Yu et al. 2013; Huntington et al. 2007b).

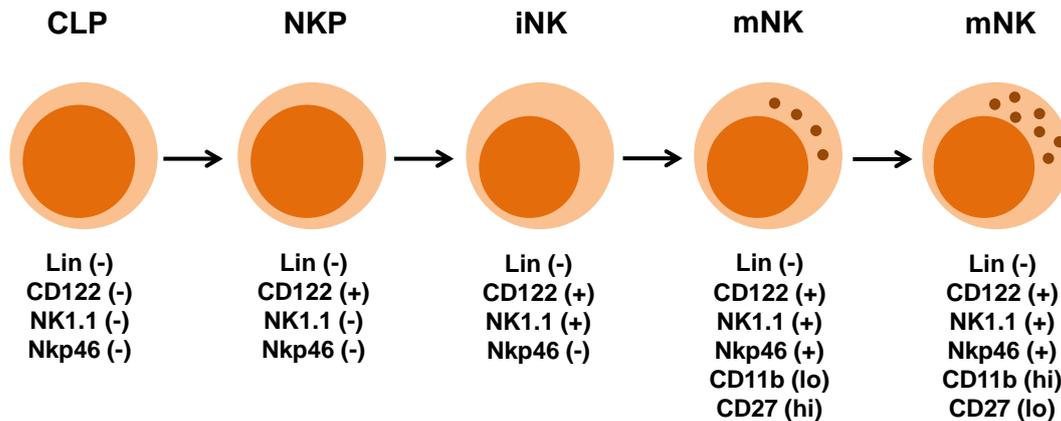


Abb. 2.1: Entwicklung von reifen NK-Zellen

NK-Zellen entwickeln sich aus der gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle (CLP), die noch keine Linien-spezifischen Oberflächenmarker exprimiert. In der ersten NK-spezifischen Entwicklungsstufe (NKP = NK-Precursor) exprimieren NK-Vorläuferzellen CD122. Nachfolgend erfolgt mit der Expression von NK1.1 die Reifung zur unreifen NK-Zelle (iNK). In der nächsten Entwicklungsstufe wird der NK-Marker Nkp46 auf der Zelloberfläche exprimiert und als reife NK-Zelle zytotoxisches Potential erlangt. Die weitere Entwicklung ist durch die differentielle Expression von CD11b und CD27 gekennzeichnet. lo = low (wenig exprimiert), hi = high (hoch exprimiert). (Adaptiert nach Yu et al., 2013)

Aus dem CHILP entwickeln sich die nicht-zytotoxischen ILC-Untergruppen, die eher den T-Helferzellen ähneln. Unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors T-bet entwickeln sich Nkp46⁺ ILC1 (Klose et al. 2014; Daussy et al. 2014; Gordon et al. 2012). Die T-bet⁺Eomes⁻ ILC1 exprimieren die α -Kette des IL-7-Rezeptors (IL-7R α , CD127) sowie CD122, sind in ihrer Entwicklung aber eher von Signalen durch IL-15 als von IL-7 abhängig (Klose et al. 2014). Die nichtzytotoxischen ILC2 und ILC3 benötigen IL-7 zur Entwicklung (Klose et al. 2014; Zook und Kee 2016).

Auch die klassischen NK-Zellmarker Nkp46 und NK1.1 sind auf ILC1 nachweisbar (Klose et al. 2014; Spits et al. 2016). Zu den Nkp46⁺-ILCs gehört ebenfalls eine Gruppe von Zellen, die aufgrund der Expression von ROR γ t den ILC3 zugeordnet wird. Es wurde gezeigt, dass diese ROR γ t⁺-ILC3 unter Einfluss von IL-2, IL-12 und IL-15 deutlich weniger ROR γ t exprimieren (Bernink et al. 2013; Vonarbourg et al. 2010). Dafür wird T-bet in diesen Zellen hochreguliert und sie beginnen IFN- γ zu produzieren, gleichen sich also dem Profil der ILC1 an. Zur Stabilisierung der ROR γ t-Expression von ILC3, ist der Einfluss von IL-7 nötig (Vonarbourg et al. 2010). Mit dem Verlust von ROR γ t und Entwicklung des ILC1-Profiles geht die Hochregulierung von CD122, Nkp46 und NK1.1 sowie der Verlust von IL-7R α einher (Klose et al. 2014). Daher gehören die sogenannten „ex-ILC3“ auch zur Population der Nkp46⁺-ILC1. Ähnlich wie bei den T-Helferzell-Subtypen ist diese Plastizität zwischen den einzelnen Subpopulationen der ILCs abhängig vom Zytokinmilieu des umgebenden Gewebes (Vonarbourg et al. 2010; Klose et al. 2014).

2.2.3 Die Rolle von IL-15 in der Entwicklung von NKp46⁺-ILCs

Die Expression des IL-15-Rezeptors markiert einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von NKp46⁺-ILC1, da das Zytokin IL-15 für die Entwicklung von ILC1 essentiell ist. In IL-15-defizienten Mäusen zeigt sich eine deutliche Reduktion der NKp46⁺-ILC1 inklusive der NK-Zellen sowie ihrer Zytotoxizität (Lodolce et al. 1998; Kennedy et al. 2000; Klose et al. 2014). Der IL-15-Rezeptor besteht zum einen aus CD122, der gemeinsamen β -Kette des IL-2- und IL-15-Rezeptors, und zum anderen aus der „common γ chain“ (gemeinsame γ -Kette = γ_c , auch CD132) (Budagian et al. 2006). Die γ_c -Kette ist die signaltransduzierende Untereinheit der Rezeptoren für die Zytokine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 (Murphy et al. 2012; Budagian et al. 2006). Durch die gemeinsame Nutzung der beiden Rezeptorketten CD122 und γ_c sind die Zytokine IL-2 und IL-15 funktionell ähnlich, sowohl hinsichtlich der Wirkung auf ILC1, aber auch in der Wirkung auf T- und B-Zellen (Meazza et al. 2011). Sowohl der IL-2-Rezeptor (IL-2R) als auch der IL-15-Rezeptor (IL-15R) besitzen jeweils eine spezifische α -Kette. Beim IL-15R liegt erst bei Vorhandensein der α -Kette die hochaffine Form des Rezeptors vor. An die α -Kette bindet IL-15 auch in Abwesenheit von CD122 und der γ_c . Im Gegensatz dazu besteht bei der alleinigen Expression der α -Kette des IL-2R nur eine geringe Affinität für IL-2 (Budagian et al. 2006).

Es wurde gezeigt, dass IL-2-defiziente Mäuse eine normale NK-Zellentwicklung durchlaufen, während sich bei Fehlen der γ_c -Kette nur wenig reife NK-Zellen entwickeln (Vosshenrich et al. 2005). Ein ähnliches Bild ergibt sich bei fehlender α -Kette des IL-15R. Dies legt nahe, dass IL-15, nicht aber IL-2, entscheidend für die NK-Zellentwicklung ist (Vosshenrich et al. 2005; Meazza et al. 2011; Koka et al. 2003). Welche intrazellulären Signalwege zur IL-15-abhängigen Entwicklung von NKp46⁺-ILC1 und deren Überleben in der Peripherie beitragen, ist jedoch kaum verstanden.

2.3 Signalwege der Apoptose

2.3.1 Apoptose

Für die Entwicklung und die Differenzierung von Zellen und Geweben ist die Apoptose, die auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird, von grundlegender Bedeutung. Im Gegensatz zur Nekrose, die oft im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen zu beobachten ist, handelt sich bei der Apoptose um einen stark regulierten Prozess zur Beseitigung von strapazierten, infizierten, entarteten oder nicht funktionstüchtigen Zellen (Danial und Korsmeyer 2004). Darüber hinaus ist Apoptose auch entscheidend für den Erhalt der Immuntoleranz gegenüber körpereigenen Antigenen. So spielt Apoptose zum Beispiel eine entscheidende Rolle bei der T-Zellentwicklung im Thymus. Durch die Induktion von

Apoptose werden hier potentiell autoreaktive T-Zellvorläufer eliminiert, was entscheidend zur immunologischen Selbsttoleranz beiträgt (Murphy et al. 2012).

Es sind zwei Wege der Apoptoseinduktion bekannt: der intrinsische, mitochondrial induzierte Weg und der extrinsische, über sogenannte Todesrezeptoren vermittelte Weg (Murphy et al. 2012). Beide Apoptose-Signalwege werden durch pro- und anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie reguliert (Youle und Strasser 2008). Die Einleitung der Apoptose erfolgt durch die Aktivierung von Caspasen. Caspasen sind zytosolische Proteasen, die als inaktive Procaspasen in der Zelle vorliegen (Nicholson 1999; Siegel 2006). Die Caspasen 2, 8 und 9 sind die sogenannten Initiator-Caspasen des intrinsischen Apoptose-Signalweges. Caspase 9 wird über den mitochondrialen Weg rezeptorunabhängig aktiviert. Ist die Zelle zum Beispiel zytotoxischen Substanzen ausgesetzt, ändert sich das Membranpotential der Mitochondrien und Cytochrom C wird freigesetzt. Dies führt zur Bildung der aktiven Form von Caspase 9. Die extrinsische Aktivierung von auf der Zelloberfläche exprimierten Todesrezeptoren wie Fas, TRAIL-Rezeptor (*TNF-related apoptosis inducing ligand* Rezeptor, TRAILR) und TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) führt zu der Aktivierung von Caspase 8 (Lavrik 2005; Murphy et al. 2012). Durch die Interaktion mit dem Todesrezeptor erfolgt eine autoproteolytische Spaltung der Procaspase 8 in die aktive Form von Caspase 8. Caspase 8 und Caspase 9 katalysieren im Zytoplasma die proteolytische Aktivierung von Procaspase 3 zur Caspase 3 als Effektor-Caspase (Siegel 2006). Diese Effektor-Caspase aktiviert weitere Enzyme, z.B. Endonucleasen, die intrazellulär die DNA-Fragmentierung katalysieren. Letztlich führt die Aktivierung des Caspase-Signalweges zur Kondensation des Zellkerns, der Fragmentierung der DNA und zum Zerfall der Zelle in membranumschlossene apoptotische Körperchen. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es nicht zu einer Entzündungsreaktion im umliegenden Gewebe. (Murphy et al. 2012).

2.3.2 Todesrezeptoren

Todesrezeptoren sind eine Untergruppe der TNF-Rezeptor-Superfamilie und werden auf verschiedenen Zellen des Immunsystems sowie vielen weiteren Körperzellen exprimiert (Smith et al. 1994; Ashkenazi und Dixit 1999; Aggarwal 2003). Es sind acht unterschiedliche transmembran-verankerte Todesrezeptoren bekannt: TNFR1, Fas, DR3, TRAILR1, TRAILR2, DR6, EDAR und NGFR (Locksley et al. 2001; Lavrik 2005). Die Liganden der Todesrezeptoren sind entweder membrangebundene oder lösliche Moleküle wie zum Beispiel TNF- α , Fas-Ligand (FasL), oder TRAIL (Aggarwal 2003; Locksley et al. 2001).

Bei Bindung des Liganden an den jeweiligen Todesrezeptor wird über unterschiedliche Signalwege Apoptose induziert (Lavrik 2005). Einer der am besten untersuchten Todesrezeptoren ist Fas. Bei Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Ausbildung von Todessignal-induzierenden Signalkomplexen (death-inducing signaling

complexes = DISC). Dafür wird an den intrazellulären Teil des Rezeptors Fas die Todesdomäne (death domain = DD) und das Adapterprotein Fas-assoziierte Todesdomäne (Fas-associated death domain = FADD) gebunden. FADD rekrutiert über die Todeseffektordomäne (death effector domain = DED) Procaspase 8 und aktiviert diese (Lavrik und Krammer 2011; Murphy et al. 2012) (Abb. 2.2).

Der Signalweg des TNFR1 ist dem von Fas ähnlich. Auch der TNFR1 verfügt über eine intrazelluläre DD, die bei Ligandbindung mit dem zytoplasmatischen Protein TNFR-assoziierte Todesdomäne (TNFR-associated death domain = TRADD) interagiert (Shu et al. 1997). TRADD rekrutiert FADD und induziert die Aktivierung von Caspase 8. Über Rekrutierung des Adapterproteins TRAF2 wird zudem die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B stimuliert (Micheau und Tschopp 2003; Wang et al. 2008; Wertz und Dixit 2009) (Abb. 2.2). NF- κ B blockiert wiederum die Apoptose durch Hochregulieren von anti-apoptotischen Molekülen (Micheau et al. 2001). Die Interaktion von verschiedenen Molekülen im TNFR-Signalweg ist komplex und noch nicht vollständig aufgeklärt (Silke 2011). Eindeutig ist jedoch, dass eine differenzierte Regulation von Apoptose notwendig ist, da es z.B. bei Fehlfunktion von Todesrezeptoren gehäuft zu Autoimmunerkrankungen kommen kann (Comi et al. 2012; Paunovic et al. 2012).

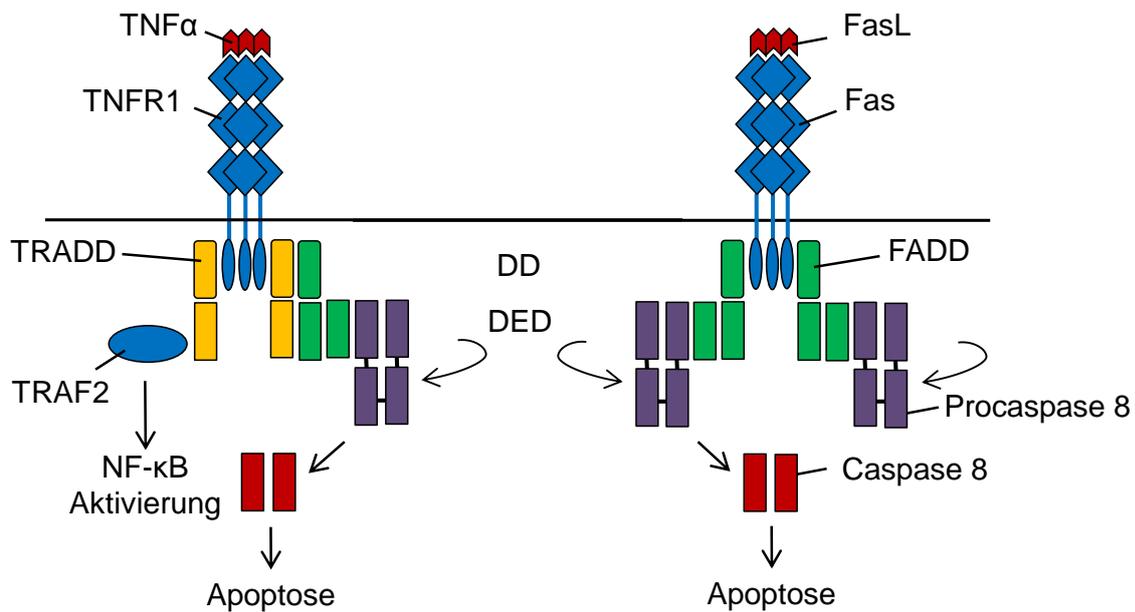


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen des extrinsischen Weges der Apoptoseinduktion

Bei der Bindung des Fas-Liganden (FasL) an den Rezeptor Fas kommt es zur Anlagerung des Adapterproteins FADD (Fas-assoziierte Todesdomäne). Durch die Interaktion von DD (Todesdomänen) und DED (Todeseffektordomänen) wird Procaspase 8 rekrutiert. Durch autokatalytische Dimerisierung entsteht die aktive Caspase 8. Dies initiiert die Aktivierung der Apoptose-Kaskade. Bei Bindung von TNF- α an den TNFR1 (TNF Rezeptor 1) kommt es zur Anlagerung des Adapterproteins TRADD (TNFR-assoziierte Todesdomäne) über die zytosolische DD des Rezeptors und die DD des Adapterproteins. TRADD kann zwei Signalwege initiieren: Entweder die Einleitung der Apoptose über Rekrutierung von FADD oder Anlagerung des Adapterproteins TRAF2, was die Aktivierung von NF- κ B zur Folge hat. (Adaptiert nach Lavrik et al., 2005 und Krueger et al., 2001)

2.3.3 Das Protein c-Flip

Gesunde Zellen verfügen über Schutzmechanismen, um sich vor Apoptose zu schützen. Eine wesentliche Rolle dabei spielen anti-apoptotische Proteine, die den intrinsischen oder extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion regulieren können. Zu diesen Proteinen gehört das Protein c-Flip, auch bekannt als „cellular FLICE/caspase-8 inhibitory protein2“ (Irmeler et al. 1997; Shu et al. 1997; Hu et al. 1997b). 1997 wurden verschiedene Formen von viralem Flip (Thome et al. 1997; Hu et al. 1997a) und die zelluläre Form c-Flip (Irmeler et al. 1997; Hu et al. 1997b; Shu et al. 1997) im Menschen entdeckt. Das Gen *Cflar* kodiert für das Protein c-Flip. In humanen Zellen können drei Isoformen von c-Flip exprimiert werden: Die lange Form c-Flip_L, die kurze Form c-Flip_S (Irmeler et al. 1997) und die Sonderform c-Flip_R, die in einigen murinen B- und T- Zelllinien und humanen T-Zellen zu finden ist, (Golks et al. 2005). Das murine *Cflar*-Gen codiert für c-Flip_L und c-Flip_R, jedoch nicht für c-Flip_S (Ueffing et al. 2008). Die c-Flip_L-Form ähnelt in ihrer Struktur der Procaspase-8 mit Ausnahme der für die

enzymatische Aktivität wichtigen Aminosäuren (Irmeler et al. 1997). c-Flip_R und c-Flip_S sind dagegen verkürzte Formen ohne diese Domäne (Golks et al. 2005; Ueffing et al. 2008). Alle c-Flip Formen bestehen unter anderem aus zwei DED (Irmeler et al. 1997; Krueger et al. 2001). Die DED interagieren mit FADD und blockieren die autokatalytische Dimerisierung von Procaspase-8 (Thome und Tschopp 2001; Zhang 2005; Huang et al. 2010), wie in Abb. 2.3 vereinfacht dargestellt. Die anti-apoptotische Wirkung von c-Flip wurde in T-Zellen (Irmeler et al. 1997), B-Zellen (Wang et al. 2000; Hennino et al. 2000), DCs (Rescigno et al. 2000), Makrophagen (Perlman et al. 1999) und Granulozyten (Huang et al. 2010) nachgewiesen.

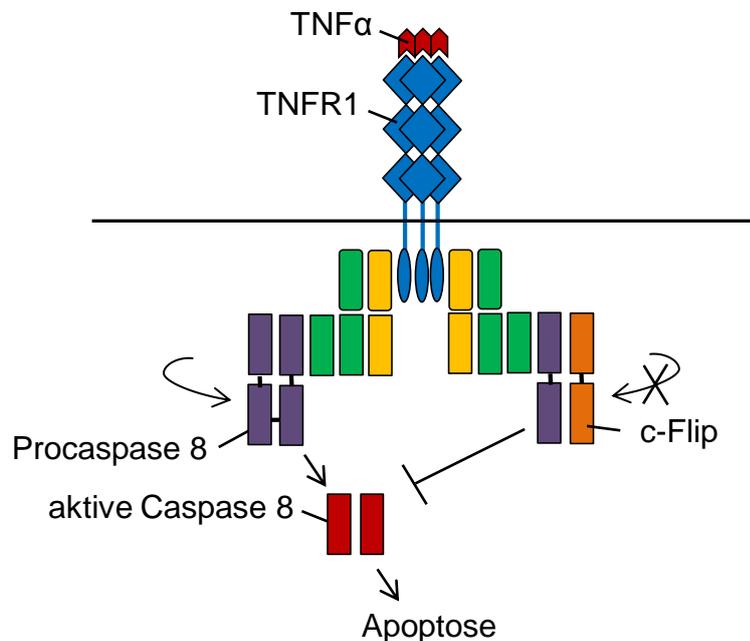


Abb. 2.3: c-Flip blockiert Apoptose am TNFR1. In Abwesenheit von c-Flip führt die Bindung von TNF- α an den TNFR1 (TNF Rezeptor 1) zur Aktivierung der Procaspase 8 und damit zum Start des Apoptose-Signalweges. Da alle c-Flip-Formen aus zwei DED (Todeseffektordomänen) ohne enzymatische Aktivität bestehen, wird durch Anlagerung von c-Flip an ein Procaspase 8-Molekül die autokatalytische Aktivierung von Caspase 8 und somit die Einleitung der Apoptose unterbunden (adaptiert nach Lavrik et al., 2005 und Krueger et al., 2001).

Die Interaktion von FADD, c-Flip und Caspase 8 spielt während der Embryogenese eine entscheidende Rolle in Fibroblasten, Endothelzellen und Herzmuskelzellen. Konventionelle c-Flip-Knockout-Mäuse entwickeln sich aufgrund starker Herzfehlbildungen nur bis zum 10. Tag der Embryogenese (Yeh et al. 2000). Da diese c-Flip-Knockout-Mäuse nicht lebensfähig sind, konnte die Funktion von c-Flip in unterschiedlichen Zelltypen und Organen bisher nur unzureichend untersucht werden.

c-Flip verfügt nach aktuellem Kenntnisstand über vielfältige Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen, die über die anti-apoptotische Wirkung hinausgehen. Es wurde gezeigt, dass c-Flip in der T-Zelllinie Jurkat (T-ALL) die NF κ B- und Erk-Signalwege aktiviert und so auch deren Proliferation steuert (Thome und Tschopp 2001; Zhang 2005; Huang et al. 2010). Zusätzlich kann c-Flip die Ubiquitinierung von β -Catenin beeinträchtigen, was zu einem verstärkten Wnt-Signal führt (Naito et al. 2004).

Interessant ist auch, dass die Expression von c-Flip durch NF- κ B reguliert wird (Micheau et al. 2001). Über die genauen Regulationsmechanismen sowie die Funktion von c-Flip in ILCs ist bisher wenig bekannt.

2.3.4 Apoptose in NKp46⁺-ILCs

Einer der Hauptmechanismen, über den die NK-Zellen in der angeborenen Immunabwehr wirken, ist die Fähigkeit in anderen Zellen Apoptose zu induzieren (Vivier et al. 2008). NK-Zellen exprimieren Todesrezeptorliganden wie TNF- α , FasL, und TRAIL, um die Abtötung von virusinfizierten Zellen oder Tumorzellen zu induzieren (Kashii et al. 1999; Wallin et al. 2003). Auch die nicht-zytotoxischen ILC1 sezernieren TNF- α (Klose et al. 2014; Vonarbourg et al. 2010). Ungeklärt ist jedoch, wie sich NKp46⁺-ILCs vor Apoptose schützen. Bisher ist nur bekannt, dass Regulatoren des intrinsischen Apoptosesignalweges Auswirkungen auf das Überleben von NK-Zellen haben. (Huntington et al. 2007a). Die Proteine Bim und Noxa gehören zu den pro-apoptotischen Bcl-2-Proteinen. In IL-15-defizienten Mäusen wird die Expression von Bim und Noxa nicht unterdrückt, so dass es vermehrt zur Apoptose der NK-Zellen kommt. Außerdem zeigt sich beim Mangel von IL-15 ein Verlust des anti-apoptotischen Proteins Mcl-1 (Huntington et al. 2007a). IL-15 moduliert demnach über die Expression von Bim, Noxa und Mcl-1 den intrinsischen Weg die Apoptose in NK-Zellen (Huntington et al. 2007a). Wie der extrinsische Weg der Apoptose in ILCs reguliert wird, ist nicht geklärt und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.4 Zielstellung

In Anbetracht der Tatsache, dass NK-Zellen und nicht-zytotoxische ILC1 Todesrezeptorliganden sezernieren (Klose et al. 2014; Vonarbourg et al. 2010), stellt sich die Frage, wie sich NKp46⁺-ILCs selbst vor der autokrinen Wirkung dieser Apoptosesignale schützen. Diese Frage ist von hoher Relevanz, da die intrazellulären Signalwege, die zur Entwicklung und zum Überleben von ILCs beitragen, kaum verstanden sind. Ob und wie die Expression des anti-apoptotischen Proteins c-Flip die Bildung und/oder das Überleben von ILCs beeinflusst, war zu Beginn der vorliegenden Arbeit unbekannt. Um diese Frage zu beantworten, wurden konditionale c-FLIP-Knockout-Mäuse (c-FLIP^{fl/fl}) (Zhang 2005) mit NKp46-Cre-transgenen (NKp46-Cre⁺) (Narni-Mancinelli et al. 2011) Mäusen verpaart. In den resultierenden NKp46^{Δc-FLIP}-Mäusen wird die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *NKp46*-Promotors exprimiert und ist somit in NKp46⁺-ILCs aktiv. Im *Cflar*-Gen dieser Maus flankieren loxP-Sequenzen einen für die Genfunktion essentiellen Teil. Werden die loxP-Sequenzen von der Rekombinase Cre erkannt, wird das loxP-flankierte Gensegment eliminiert und somit das *Cflar*-Gen inaktiviert. Mit Hilfe der NKp46^{Δc-FLIP}-Mäuse ist es demnach möglich, das *Cflar*-Gen selektiv in NKp46⁺-ILCs zu inaktivieren und damit die Produktion von c-Flip zu verhindern.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen 1) ob die Inaktivierung von c-Flip in NKp46⁺-Zellen einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems hat und 2) über welchen Mechanismus c-Flip die Entwicklung NKp46⁺-ILCs beeinflusst?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Ausrüstung

Gerät	Firma
Zentrifuge Megafuge 40R	Heraeus Thermo Scientific
Zentrifuge Pico 17	Heraeus Thermo Scientific
Durchflusszytometer LSR Fortessa	BD Bioscience
Durchflusszytometer Canto II	BD Bioscience
Durchflusszytometer und Zellsortierer FACS Vantage SE DiVA	BD Bioscience
Inkubator Heracell 240i	Thermo Scientific
AutoMACS	Miltenyi Biotech
PCR Machine T300 Thermocycler	Biometra
Thermomix Compact	Eppendorf
Mikrowelle	Severin
Microskop Primo vert	Zeiss
DynaMag™-2 Magnet	Life Technologies

3.1.2 Software

BD FACSDiva™	BD Biosciences
FlowJo 9.7.5	TreeStar
Graphpad Prism 5.1	Graphpad Software

3.1.3 Reagenzien

Reagenz	Firma
7-AAD Lebendfarbstoff	Biolegend
BD FACS Lyse Lösung	BD Biosciences
dNTP	Applied Biosystems / Roth
Easy Ladder I	Bioline
Easycoll	Biochrom
Ethidiumbromid	Roth
Gibco HEPES (1 M)	Life Technologies
Isofluran CP	CP Pharma
Orange G	Sigma / Applichem
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Primocin	Amaya

Proteinase K	Sigma Aldrich
Q-VD-OPH	MP Biomedicals
Rekombinanter Muriner Flt3-Ligand	PeptoTech
Recombinant Murine IL-15	PeptoTech
Recombinant Murine IL-7	eBioscience
Recombinant Murine SCF	PeptoTech
Streptavidin	BD Biosciences
Superscript II reverse Transcriptase	Invitrogen
TaqMan Universal PCR Mastermix	Applied Biosystems
1-Thioglycerol	Sigma-Aldrich
Trypsin/EDTA-Lösung (10x), 0,5%/0,2% (w/v) in (10x) PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom

3.1.4 Antikörper und Microbeads

3.1.4.1 Antikörper und sekundäre Reagenzien

Name	Klon	Firma
B220	RA3-6B2	Biolegend
CD11b	MI70	Biolegend
CD11c	N418	Biolegend
CD122	TMb1	Biolegend
CD127	A7R34	Biolegend
CD16/CD32 Fc block	2.4G2	eigene Herstellung
CD19	1D3	eBioscience
CD19	6D5	Biolegend
CD21	eBio8D9	eBioscience
CD23	B3B4	eBioscience
CD27	LG.7F9	eBioscience
CD3e	145-2C11	Biolegend
CD4	GK1.5	Biolegend
CD4	RM4-5	BD Biosciences / Biolegend
CD44	IM7	Biolegend
CD45	30-F11	Biolegend
CD45.2	104	Biolegend
CD5	53-7.3	BD Biosciences
CD62L	MEL-14	BD Biosciences
CD8a	53-6.7	Biolegend
CD90.2	53-2.1	Biolegend
CD95	15A7	eBioscience

F4/80	BM8	Biolegend
Gr1	RB6-8-C5	Biolegend
H2kb	AF6-88.5	Biolegend
I-Ab	AF6-120.1	Biolegend
IgD	11-26c	eBioscience
IgM	II/41	eBioscience
KLRG1	2F1	eBioscience
Ly-6G	1A8	Biolegend
NK1.1	PK136	BioLegend
NKp46	29A1.4	BD Biosciences / Biolegend / eBioscience
Purified CD178 (FasL)	MFL4	Biolegend
Purified CD253 (TRAIL)	N2B2	Biolegend
Purified TNF- α	MP6-XT22	Biolegend
Purified Rat IgG1	RTK2071	Biolegend
Purified Rat IgG2a	RTK2758	Biolegend
Purified Armenian Hamster IgG	HTK888	Biolegend
TER119	TER119	Biolegend

3.1.4.2 Microbeads

Microbeads

Dynabeads Biotin Binder

Firma

Invitrogen (Life Technologies)

3.1.5 Mauslinien

NKp46Cre⁺ Mäuse (Narni-Mancinelli et al. 2011) wurden von Prof. Eric Vivier (Marseille) zur Verfügung gestellt. In das Genom der NKp46Cre-Maus wurde das Transgen der Cre-Rekombinase durch das Knock-In-Verfahren eingebracht (Narni-Mancinelli et al. 2011). Die Cre-kodierende cDNA wurde so in das 3'-Ende des *NKp46*-Gens dieser Maus integriert, dass die Cre-Expression unter Kontrolle des *NKp46*-Promotors erfolgt (Narni-Mancinelli et al. 2011). Durch das Einbringen des Cre-Transgens wird jedoch die Expression des modifizierten *NKp46*-Allels beeinträchtigt, sodass die Expression des NKp46-Proteins nur in Mäusen gewährleistet ist, die heterozygot für Cre sind.

Konditionale c-FLIP^{fl/fl}-Mäuse (Zhang 2005) wurden von Prof. Ingo Schmitz (Braunschweig) zur Verfügung gestellt. In diesen Tieren wurden loxP-Sequenzen so in das *Cflar*-Gen integriert, dass dieses mittels Cre-medierter Rekombination inaktiviert und so die Expression des c-FLIP-Proteins verhindert werden kann.

Um das *Cflar*-Gen selektiv in NKp46⁺-ILCs zu inaktivieren, wurden NKp46Cre⁺-Mäuse mit c-FLIP^{fl/fl}-Mäusen verpaart, um NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{fl/fl} (NK ^{Δ c-FLIP})-Mäuse zu generieren. Als Kontrollen wurden NK^{WT}-Mäuse eingesetzt, die mindestens ein intaktes *Cflar*-Allel besaßen.

Hierzu zählten NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/wt}-Mäuse. Um *Cflar*-unabhängige, Cre-Effekte auszuschließen (Schmidt-Supprian und Rajewsky 2007) wurden in einigen Experimenten auch NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} als NK^{WT}-Kontrolltiere verwendet. Die Genotypen der jeweils verwendeten NK^{WT}-Mäuse sind in den Legenden der jeweiligen Abbildungen zu entnehmen.

Die Tiere des Genotyps NK^{Δc-FLIP} zeigen bezüglich Entwicklung, Fruchtbarkeit und äußerem Erscheinungsbild einen vergleichbaren Phänotyp wie die Kontrolltiere. Die Vererbung der Transgene folgt den mendelschen Frequenzen.

3.1.6 PCR-Primer

NKp46Cre

NKp46ex7-Forward: 5'-GGA ACT GAA GGC AAC TCC TG-3'
 NKp46-IRES-Reverse: 5'-CCC TAG GAA TGC TCG TCA AG-3'
 NKp46ex7- Reverse: 5'-TTC CCG GCA ACA TAA AAT AAA-3'

FLIP-fl

FLIP-flox-Forward: 5'-TAG CTG ATG CAT GAG CCT GAG C-3'
 FLIP-flox-Reverse: 5'-GTA CCA GAA CTC TCC AGT CAT ACT TG-3'

3.1.7 Puffer, Lösungen, Nährmedien

ACK Lyse Puffer (1x): 0,1 mM Na₂EDTA
 10 mM KHCO₃
 155 mM NH₄Cl
 pH: 7,2-7,4

MACS Puffer (1x): 1x PBS
 2 mM EDTA
 0,5 % BSA
 pH: 7,2-7,4

PBS (1x): 1,7 mM NaH₂PO₄
 6,5 mM Na₂HPO₄
 154 mM NaCl
 pH: 7,2-7,4

PBS-EDTA (1x):	1x PBS 2 mM EDTA pH: 7,2-7,4
PBS-Heparin:	1x PBS 5000 U Heparin/l 0,03 % NaN ₃
OP9 Medium:	α-MEM 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 1 mM Na-Pyruvat 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
TAE Puffer (50x):	242 g Tris-Base 57 ml Acetic Acid 100 ml 0,5 M EDTA pH: 8,0
Biopsie-Lyse-Puffer (1x):	100 mM Tris/HCl (pH 8) 5 mM Na ₂ EDTA (pH 8) 0,2 % SDS (pH 7,2) 200 mM NaCl
TE Puffer (1x):	10 mM Tris/HCl (pH 8) 0,1 mM Na ₂ EDTA (pH 8)
Ladepuffer	0,2 % w/v Orange G (practical grade) 30 % v/v Glycerol 70 % v/v H ₂ O
Standard-Medium	RPMI 1640 10 % FCS 100 U/ml Penicillin-Streptomycin

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Isolation genomischer DNA aus Mausgewebe

4-6 Wochen alten Mäusen wurden Schwanzspitzen- oder Ohrbiopsien entnommen. Die Gewebeprouben wurden mit 600 µl Biopsie-Lyse-Puffer und 20 mg/ml Proteinase K für mindestens 4 Stunden (h) bei 56° und 350 Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute, rpm) im Thermomixer lysiert. Danach wurden die Lysate 5 Minuten (min) bei 13800 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues 1,5 ml Reagenzgefäß überführt und die DNA im Überstand mit 600 µl -20°C kaltem 2-Propanol für 10 min bei Raumtemperatur gefällt. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei 13800 x g wurde das Pellet mit 600 µl -20°C kaltem 100% Ethanol gewaschen und wieder für 5 min bei 13800 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet bei Raumtemperatur (RT) getrocknet. Je nach Biopsiegröße wurde das DNA-Pellet in 50-300 µl TE Puffer für 1 h unter horizontalem Schütteln (350rpm) bei 68°C gelöst.

3.2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wird genutzt, um eine bestimmte DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Dazu binden Primer an die komplementäre Zielregion auf der DNA und kennzeichnen so den Genabschnitt, der vervielfältigt werden soll. Mit Hilfe des Enzyms Taq-Polymerase wird die Menge an DNA über mehrere Zyklen amplifiziert. Dazu wird die DNA stark erhitzt, bis sie denaturiert und in zwei Einzelsträngen vorliegt. An diese Einzelstränge können nun jeweils die komplementären Primer binden und die spezifische Region für den Startpunkt der Taq-Polymerase kennzeichnen. Die Taq-Polymerase synthetisiert nun einen neuen komplementären DNA-Einzelstrang. Dieser Prozess wird für 30-40 Zyklen wiederholt, so dass das gewünschte DNA-Fragment am Ende in vielfacher Form vorliegt. Dieses Verfahren kann zum Beispiel zur Genotypisierung transgener Mäusen genutzt werden. In Tabelle 1 sind die Reagenzien aufgeführt, die zur Herstellung eines PCR-Reaktionsansatzes für die jeweilige PCR notwendig ist. Tabelle 2 zeigt die Einstellungen von Temperatur und Zeit, die während der verschiedenen Zyklen für die Amplifikation der DNA-Abschnitte notwendig sind.

A	Reagenz	Volumen [μ l]	B	Reagenz	Volumen [μ l]
	H ₂ O	12,9		H ₂ O	15,3
	10x-Puffer	5		10x-Puffer	5
	MgCl ₂ (25 mM)	2		MgCl ₂ (1,5 mM)	0,5
	dNTPs (2,5 mM)	2		dNTPs (0,2 mM)	0,5
	NKp46ex7-Forward (10 μ M)	1		FLIP-flox-Forward (10 μ M)	0,8
	NKp46-IRES- Reverse (10 μ M)	1		FLIP-flox-Reverse (10 μ M)	0,8
	NKp46ex7- Reverse (10 μ M)	1		Rediload	1
	Platinum Taq	0,1		Platinum Taq	0,1
	DNA	1		DNA	1

Tabelle 1: A) Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, das für die PCR zum Nachweis des *NKp46Cre*-Gens benötigt wird B) Zusammensetzung des Reaktionsgemisches, das für die PCR zum Nachweis des *Cflar*-Gens benötigt wird

PCR-Schritt	NKp46Cre			Flip-fl		
	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen	T [°C]	Zeit [s]	Zyklen
Polymerase-Aktivierung	95	120	1x	93	180	1x
Denaturierung der DNA	95	30	34x	93	30	40x
Primerhybridisierung	56,2	30		66	30	
Elongation	72	40		65	90	
Letzte Elongation	72	300	1x	65	300	1x
Stop der Reaktion	10			10		

Tabelle 2: Einstellung von Temperatur und Dauer der PCR-Zyklen für die NKp46Cre-PCR und die FLIP-fl-PCR

3.2.1.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine biochemische Methode zur Auftrennung von DNA-Strängen nach ihrer Größe. Durch Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich die negativ geladene DNA durch das Agarose-Gel zur Anode. Die kleinen DNA-Sequenzen wandern schneller durch das Gel als die großen.

Zum Nachweis der PCR-Produkte für die Genotypisierung der Mäuse wurden 1,5 bis 3 % Agarose-Gele eingesetzt. Dazu wurden 1,5 bis 3 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer aufgekocht und in vorbereitete Ständer gegossen. 5 μ l „DNA Ladder“ (Easy Ladder I) wurde als Größenstandard mit den DNA-Proben nach der Polymerisation auf das Gel aufgetragen und bei 120 V für 40 min aufgetrennt. Danach wurden die Gele in Ethidiumbromid-TAE-Puffer für 20 min gefärbt und die Banden unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abb 3.1).

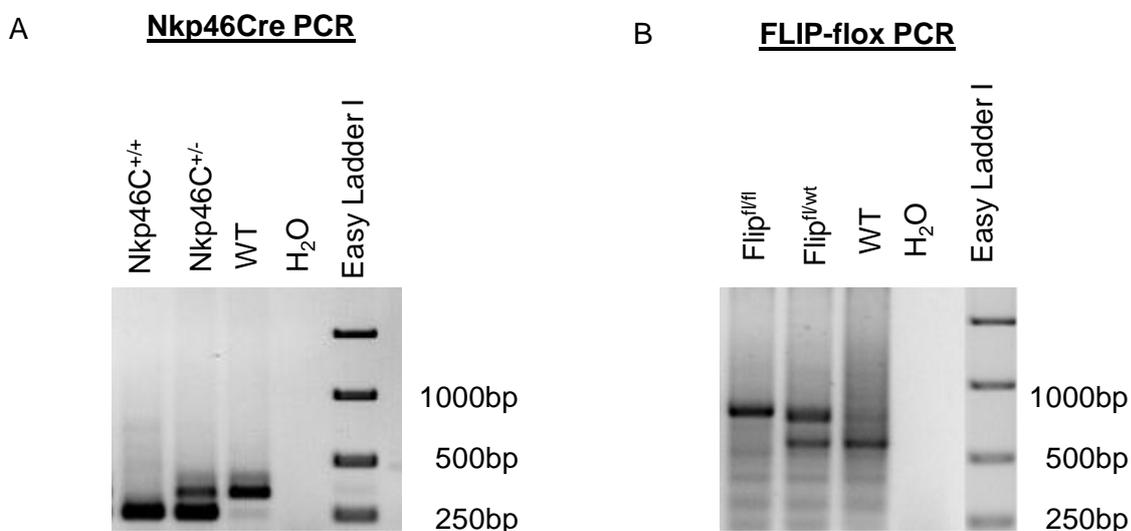


Abb. 3.1: Genotypisierung von NK^{Δc-FLIP} Mäusen mittels PCR und Agarose-Gelelektrophorese

A) Der Nachweis des Cre-Transgens im Genom der NKp46Cre⁺ Maus erfolgte mittels PCR unter Verwendung spezifischer Primer (s. 3.1.6), mit deren Hilfe sich ein 247bp großes DNA-Segment amplifizieren lässt. Die Amplifikation des Wildtyp-Allels führt zur Bildung eines 300bp großen Fragments. Dementsprechend lässt sich mit der DNA homozygot Cre-transgener (NKp46C^{+/+}) Mäuse eine 247 bp große Bande nachweisen, mit der DNA einer Cre-negativen Wildtypmaus (WT) eine 300 bp große Bande und mit der DNA einer heterozygoten Maus (NKp46C^{+/-}) beide Banden.

B) Unter Verwendung spezifischer Primer (s. 3.1.6) lassen sich mittels PCR Mäuse identifizieren, die entweder auf beiden *Cflar*-Allelen loxP Sequenzen tragen (c-FLIP^{fl/fl}; Bandengröße 750bp), nur auf einem *Cflar*-Allel loxP Sequenzen tragen (c-FLIP^{fl/wt}; Bandengrößen 750 bp und 600 bp) oder auf keinem der beiden Allele loxP Sequenzen tragen (WT; Bandengröße 600 bp).

3.2.2 Zellbiologische Methoden

3.2.2.1 Präparation von Zellen aus verschiedenen Organen

3.2.2.1.1 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus der Milz

Die Milz wurde entnommen und in 2 ml 4°C kaltes PBS-EDTA überführt. Anschließend wurde die Milz mit dem Kolben einer 10 ml-Spritze durch ein Metallsieb aus rostfreiem Stahl in ein Schälchen gedrückt. Das Sieb wurde nochmals mit PBS-EDTA nachgespült. Die Zellen dieser Suspension wurden zur weiteren Vereinzlung mit einer 20G-Nadel auf einer 10 ml-Spritze mehrfach luftblasenfrei resuspendiert und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 400 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach der Erythrozyten-Lyse (siehe 3.2.2.1.4) wurde das Zellpellet in PBS-EDTA gelöst. Die Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und auf die für die nachfolgenden Analysen notwendige Zelldichte eingestellt.

3.2.2.1.2 Herstellung von Einzelzellsuspensionen aus dem Knochenmark

Zunächst wurden die Oberschenkelknochen beidseits entnommen. Um die Ausbeute an Knochenmarkzellen für *in vitro*-Versuche zu erhöhen, wurden bei Bedarf zusätzlich Unterschenkel- und Hüftknochen entnommen. Das Muskelgewebe wurde entfernt und der Knochen wurde an beiden Seiten geöffnet. Mit Hilfe einer 10 ml-Spritze und einer 27G-Nadel wurde das Knochenmark mit PBS-EDTA heraus gespült. Nachfolgend wurde die Zellsuspension bei 400 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und die Erythrozyten-Lyse (siehe 3.2.2.1.4) durchgeführt. Danach wurde das Pellet in PBS-EDTA gelöst. Die Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und für die Antikörperfärbung auf die gewünschte Zelldichte eingestellt.

3.2.2.1.3 Perfusion der Leber und Isolierung der leberständigen Leukozyten

Nach Tötung der Mäuse wurde zur Perfusion das rechte Atrium des Herzens geöffnet. Mit einer 27G-Nadel und einer 20 ml-Spritze wurden 20 ml kaltes PBS (pH 7,4) in den linken Ventrikel injiziert oder über ein Infusionssystem verabreicht, bis sich die Leber sichtbar entfärbte. Die Gallenblase wurde entfernt, die Leber entnommen und in ein 50 ml-Röhrchen mit 2 ml 4°C kaltem Standard-Medium überführt

Die Leber wurde mit einem Skalpell zerkleinert und mit einem Spritzenkolben durch ein Metallsieb gedrückt und mit 10 ml RPMI-1640 Medium plus GlutaMAX™, 25 mM HEPES und 10 % FCS (pH 7,4) nachgespült. Mit einer 10 ml-Spritze und einer 20G-Nadel wurde die Suspension zur Zellvereinzlung weiter resuspendiert, mit PBS gewaschen und für 8 min bei 500 x g und RT zentrifugiert. Darauf folgte eine Dichtegradientenzentrifugation zur Separation der Leukozyten. Dazu wurde das Pellet in 5 ml 35 % Easycoll mit 5 U/ml Heparin in Standard-Medium resuspendiert und bei 800 x g ohne Bremse für 30 min bei RT

zentrifugiert. Dabei bilden die Hepatozyten einen Film auf der Oberfläche des Dichtegradienten, wohingegen die Leukozyten durch den Gradienten wandern und ein Zellpellet bilden. Nach dem Verwerfen des Überstands und der Lyse von noch in der Leukozytenfraktion enthaltenen Erythrozyten (siehe 3.2.2.1.4) wurde das Pellet in PBS-EDTA resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Neubauer-Zählkammer gezählt und für die Antikörperfärbung auf die gewünschte Zelldichte eingestellt.

3.2.2.1.4 Erythrozyten-Lyse

Zur Eliminierung von Erythrozyten aus Leukozyten-Einzelzellsuspensionen, wurden diese zunächst sedimentiert (500 x g , 4°C) und nachfolgende in 2 ml ACK-Lyse-Puffer für 1,5 min bei RT resuspendiert. Durch die hypotonen Eigenschaften des Puffers nehmen die Erythrozyten Wasser auf und platzen. Aufgrund einer höheren osmotischen Toleranz nehmen Lymphozyten bei der kurzen Einwirkdauer des ACK-Puffers keinen Schaden. Die Reaktion wurde mit 7 ml Standard-Medium abgestoppt, die Probe durch ein 40 µm Zellsieb filtriert und bei 400 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in PBS-EDTA gelöst.

3.2.2.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung einzelner Zellen in gemischten Zellsuspensionen. Die Zellen einer Suspension werden im Flüssigkeitsstrom vereinzelt und in der Messkammer einzeln an Laserstrahlen im Durchflusszytometer vorbeigeführt. Trifft das Licht auf die Zelle, wird es gebeugt. Das dabei entstehende Vorwärtstreulicht (forward scatter: FS) erlaubt Rückschlüsse auf die Größe der Zelle und das Seitwärtstreulicht (side scatter: SS) ist ein Maß für die Granularität (SS) der Zelle. Die Lichtsignale werden im Zytometer detektiert, in elektrische Signale umgewandelt und mit Hilfe einer gerätespezifischen Software visualisiert.

Um Zellen hinsichtlich ihrer Proteinexpression im Durchflusszytometer zu analysieren, werden monoklonale Antikörper mit definierter Spezifität verwendet, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Diese werden durch die Laser des Durchflusszytometers angeregt und emittieren Licht einer definierten Wellenlänge, die für den jeweiligen Farbstoff spezifisch ist. Diese Lichtsignale werden in elektrische Signale umgewandelt und von dem angeschlossenen Computer verrechnet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen wurden die Durchflusszytometer LSR Fortessa und Canto II von BD Biosciences genutzt. Die Analyse der Daten erfolgte mittels der Software FlowJo 9.7.5.

Auf der Basis der zuvor ermittelten Gesamtzellzahl der isolierten Leukozyten eines Organs und den durchflusszytometrisch bestimmten Frequenzen wurden die absoluten Zellzahlen bestimmter Immunzellsubpopulationen berechnet.

3.2.2.3 Durchflusszytometrischer Nachweis von Molekülen auf der Zelloberfläche

Um unspezifische Bindungen der fluoreszenzmarkierten Antikörper an Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurden die Einzelzellsuspensionen vorab mit unmarkierten, CD16/32-spezifischen Antikörpern (abstammend von ATCC[®] HB-197[™]) für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert.

Für die spezifische Antikörperfärbung wurden mehrere fluoreszenzmarkierte Antikörper zu einem Antikörper-Mastermix in MACS-Puffer vereinigt. Um die Spezifität der Färbungen sowie die Geräteeinstellungen verifizieren zu können, wurden mehrere Kontrollfärbungen angesetzt. Zum einen wurden Zellen der zu analysierenden Proben (Kontrollzellen) mit jedem Antikörper aus dem Mastermix einzeln gefärbt. Darüber hinaus wurden Kontrollzellen mit modifizierten Antikörpermischungen gefärbt, in denen jeweils ein Antikörper des Mastermix fehlte. Bei letztgenannten Kontrollen handelt es sich um die sogenannten FMO (Fluorescence-minus-one)-Kontrollen. Um Moleküle auf der Zelloberfläche zu färben, wurden $2 \cdot 10^5$ Zellen in eine 96-well-Platte (V-förmiger Boden) oder in spezielle Probenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 500 x g für 2 min bei 4°C zentrifugiert und das Zellpellet in 50 µl Antikörpermix resuspendiert. Die Zellen wurden im Antikörpermix für 30 min bei 4°C lichtgeschützt inkubiert. Danach wurden 200 µl PBS-EDTA hinzugegeben und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im gewünschten Volumen für die Messung am Durchflusszytometer in PBS-EDTA aufgenommen.

3.2.2.4 Färbung von Leukozyten in Vollblutproben

Zu 50 µl Vollblut wurden 50 µl Antikörpermix gegeben und für 25-30 min bei RT lichtgeschützt inkubiert. Durch Zugabe von 1 ml BD FACS Lysing Solution und einer Inkubation für 20 min erfolgte eine Lyse der Erythrozyten in der Vollblutprobe. Es wurden 2 ml PBS EDTA auf die Probe gegeben und bei 400 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde entfernt und die verbliebenen Leukozyten in PBS-EDTA zur Messung am Durchflusszytometer resuspendiert.

3.2.2.5 Anreicherung von Zellen durch magnetische Depletion

Zur Anreicherung eines Zelltyps aus einer Suspension mit gemischten Zellpopulationen wurden die Leukozyten mit primären, biotinylierten Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmarker markiert. Nachfolgend wurden die so markierten Zellen mit Dynabeads Biotin-Binder, einem sekundären, an magnetische Beads gekoppelten anti-Biotin-Antikörper, inkubiert. Mit Hilfe eines Magneten wurden markierte Zellen gebunden und von unmarkierten Zellen der Zellsuspension getrennt. Auf diese Weise können bestimmte Zelltypen von anderen separiert werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurden mit dieser Methode CD122⁻-ILC-Vorläuferzellen durch die Depletion von CD19⁺, Ly6G⁺ (Klon 1A8), Ter119⁺-Zellen aus dem Knochenmark angereichert. Durch die Wahl dieser Zellmarker

wurden Zellen der B-Zelllinie, Monozyten, Granulozyten und Erythrozyten im Negativselektionsverfahren depletiert.

3.2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank Klasse II (Herasafe, HERAEUS) vorgenommen. Die Zellen wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5% CO₂/Luft-Gemisch kultiviert.

3.2.3.1 OP9-Stroma-Zellen

Um die NK-Zellentwicklung *in vitro* zu analysieren, wurden Vorläuferzellen aus dem Knochenmark auf OP9-Stroma-Zellen (ATCC[®] CRL-2749[™]) kultiviert. Bei den OP9-Stroma-Zellen handelt es sich um adhärenzte Zelllinie, die in hämatopoetischen Stammzellkulturen Wachstums- und Überlebenssignale bereitstellt (Nakano et al. 1994).

Die OP9-Stroma-Zellen wurden mit 0,05% / 0,02% Trypsin-EDTA von der Petrischale (100 x 15 mm Petrischale, Falcon[™]) abgelöst, bei 400 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert, in OP9-Medium resuspendiert, gezählt und auf eine Zelldichte von 3-4 * 10⁵ eingestellt. Um die Proliferation der OP9-Stromazellen zu unterbinden, wurden sie 6-26 h vor Beginn der Kokultur radioaktiv bestrahlt, so dass sie nur noch Überlebenssignale für die Vorläuferzellen bereitstellen. Die optimale Bestrahlungsdosis wurde getestet und auf 4 Gray (Gy) festgelegt. Die bestrahlten Zellen wurden in OP9-Medium in einer 24-Loch-Platte in einer Zelldichte ausgesät, die zu einer 70%igen Konfluenz führte.

3.2.3.2 ILC-Vorläuferzellen

Für die Gewinnung von ILC-Vorläuferzellen wurde aus den Knochenmarkszellen eine Einzelzellsuspension hergestellt und eine Anreicherung von CD122-exprimierenden Zellen durch magnetische Depletion von CD19⁺, Ly6G⁺, Ter119⁺-Zellen (siehe 3.2.2.4) durchgeführt. Die verbleibenden Zellen wurden mit biotinylierten Antikörpern gegen CD19, Ly6G und Ter119 für 30 Minuten bei 4°C inkubiert, bevor an Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppeltes Streptavidin für weitere 30 Minuten hinzugefügt wurde. Zusätzlich wurden CD3, CD8, CD4 mit FITC markiert, während CD122 und NK1.1 mit anderen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurden. Auf diese Weise wurde der verbliebene Anteil an Zellen, die die Linien-spezifischen Marker CD3, CD8, CD4 sowie CD19, Ly6G und Ter119 exprimieren, identifiziert.

Zur Isolation der ILC-Vorläuferzellen wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe des FACS Vantage SE DiVA nach folgender *Gating*-Strategie sortiert: ILC-Vorläuferzellen wurden durch die fehlende Expression aller Linien-spezifischen Marker und der Expression der IL-2R β -Kette (CD122⁺) identifiziert. Aus dieser Population wurden anschließend NK1.1⁺ oder NK1.1⁻-Zellen sortiert. Die NK1.1⁻-Zellen beinhalten die ILC-Vorläufer.

Die sortierten Zellen wurden auf bestrahlten OP9-Stroma-Zellen ausgesät und in 500 μ l OP9-Medium mit 20 ng/ml SCF, 20 ng/ml Flt-3 Ligand, 20 ng/ml IL-7, 20 ng/ml IL-15, 150 μ mol/L 1-Thioglycerol und Primocin für 9 Tage kultiviert (Luther et al. 2011). An Tag 4 wurde jeweils die Hälfte des Mediums gewechselt. An Tag 7 wurden die ILCs auf frische OP9-Stroma-Zellen transferiert. In einigen Experimenten wurde ein Teil der Kultur mit dem Caspase-Inhibitor Q-VD-OPH in einer Endkonzentration von 20 μ M behandelt, der alle 2,5 Tage erneut zugegeben wurde. In anderen Kulturen wurden blockierende Antikörper und deren Isotyp-Kontrollen verwendet. Diese wurden jeweils in einer Konzentration von 10 μ g/ml eingesetzt und ebenfalls alle 2,5 Tage erneut zugesetzt. Um den Zellzuwachs von Tag 0 zu Tag 9 (d9) zu bestimmen, wurde die Expansionsrate ermittelt. An Tag 9 wurden die absoluten Zellzahlen der NKp46⁺-Population mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Diese wurde zu der absoluten Zahl der eingesetzten NKp46⁺-Zellen am Tag 0 (d0) ins Verhältnis gesetzt.

3.2.4 Statistische Analyse

Die Ergebnisse der *in vivo*-Experimente (Abb. 4.1 – 4.8) sind als arithmetisches Mittel und Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde mit dem nicht-parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-Test überprüft. Die Ergebnisse der *in vitro*-Experimente (Abb. 4.9 – 4.11) sind als arithmetisches Mittel und Standardfehler des Mittelwertes (*standard error of mean*, SEM) angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mit dem Paardifferenztest (abhängiger t-Test, engl: paired-t-Test) für abhängige, verbundene Stichproben überprüft. Statistisch signifikante Unterschiede wurden wie folgt markiert: *($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) bzw. *** ($p < 0,001$).

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der Immunzellpopulationen in Blut, Milz, Leber und Knochenmark

4.1.1 Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs im Blut und in der Milz von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen

Die Entdeckung der Heterogenität der ILCs führte zur Abgrenzung von T-Helferzell-ähnlichen ILC-Populationen und NK-Zellen. Deren Funktion wurde in verschiedenen Geweben in den letzten Jahren verstärkt untersucht. Über die intrinsische Weiterleitung externer Signale in ILCs ist bisher jedoch wenig bekannt. Die anti-apoptotische Wirkung des Proteins c-Flip wurde in anderen Zellpopulationen bereits beschrieben (Chau et al. 2005; Huang et al. 2010; Plaza-Sirvent et al. 2017). Allerdings wurde die Funktion von c-Flip in NKp46⁺-ILCs bislang noch nicht genauer betrachtet. Ziel unserer Analysen war es daher, die Auswirkungen einer defizienten c-Flip-Expression in NKp46⁺-Zellen mit Hilfe von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen zu untersuchen. Dazu wurden zunächst Immunzellen in Blut und Milz von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen (beinhaltend die Kontrollgruppen NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl}) analysiert. Hierbei lag der Schwerpunkt auf Zellen, die durch die Abwesenheit des Oberflächenmarkers CD3 und die Expression des Markers NK1.1 definiert wurden. Dies beinhaltet NK-Zellen, nicht-zytotoxische ILC1 und einige NK1.1-exprimierende ILC3 (Grégoire et al. 2007; Klose et al. 2014). Zu diesem Zweck wurden Blut- und Milzzellen von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen durchflusszytometrisch analysiert, um sowohl den relativen Anteil CD3⁺NK1.1⁺ ILCs an der gesamten Immunzellpopulation als auch deren absolute Zellzahl zu bestimmen. Die in Abb. 4.1 A dargestellten repräsentativen *Dotplots* zeigen eine deutliche Reduktion von CD3⁺NK1.1⁺-ILCs in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen. Bei Kontrolltieren mit einem intakten *Cflar*-Gen ist dies nicht der Fall. Entsprechend ist die absolute Anzahl von NK1.1⁺-ILCs nach Deletion des *Cflar*-Gens in NKp46⁺-Zellen stark verringert (Abb 4.1 B). Weiterhin wurde in den CD3⁺NK1.1⁺ ILCs Zellen ausgewählt, die den Marker NKp46 exprimieren. Auch hier zeigt sich eine deutliche Reduktion der CD3⁺NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen (Abb 4.1 C). Um einen alleinigen Einfluss der Cre-Rekombinase auf die Zellzahlen auszuschließen, wurden auch NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} als NK^{WT}-Kontrollen verwendet. Wie Abb. 4.1B und C zu entnehmen ist, gab es keine nennenswerten Unterschiede innerhalb der NK^{WT}-Kontrollen. Daraus lässt sich ableiten, dass die bloße Anwesenheit der Cre-Rekombinase nicht ausreicht, um die starke Reduktion der CD3⁺NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen zu erklären. Dies setzt offensichtlich die Cre-vermittelte Inaktivierung beider *Cflar*-Allele voraus.

In weiteren Experimenten wurden die absolute Anzahl von NK1.1⁺NKp46⁺-ILC zwischen NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/wt} als NK^{WT}-Kontrolle und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen verglichen. In Abbildung 4.1 D wird gezeigt, dass in Anwesenheit von zwei intakten *Cflar*-Allelen kein Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-Zellen vorliegt. Die in Abbildung 4.1 B, C und D gezeigten Daten ließen den Schluss zu, dass ein intaktes *Cflar*-Allel ausreicht, um die Entwicklung der untersuchten ILC-Populationen zu gewährleisten. Dies machte es möglich, sowohl Cre⁻-Tiere, NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/wt} als auch NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}-Mäuse als ILC-kompetente NK^{WT}-Kontrolltiere zu verwenden.

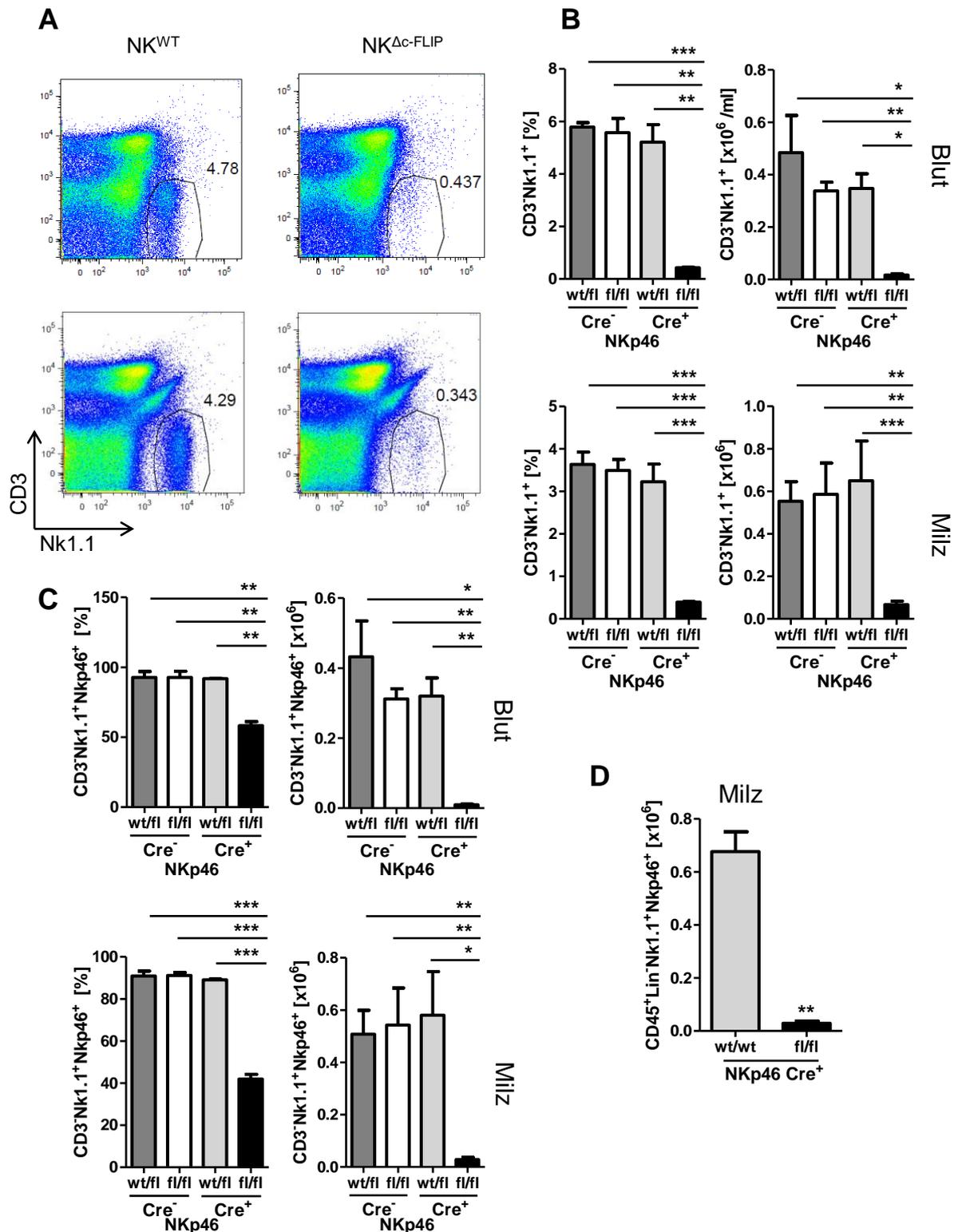


Abb. 4.1: Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs im Blut und der Milz der NK^{ΔC-FLIP}-Maus

Leukozyten aus dem peripheren Blut und aus der Milz von NK^{WT}-Mäusen und NK^{ΔC-FLIP}-Mäusen wurden nach Färbung mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen diverse Immunzellmarker durchflusszytometrisch analysiert, um den relativen Anteil der CD3⁺NK1.1⁺-ILC-Population zu bestimmen (A, B). (A) Gezeigt sind repräsentative Dotplots. Die Zahlen stellen den relativen Anteil der ILCs an der Immunpopulation im jeweiligen Organ (oben Blut, unten Milz) dar. (B) Um mögliche Einflüsse der Cre-Expression auf die Immunzellzusammensetzung zu erfassen, wurden sowohl Cre-positive als auch Cre-negative Tiere analysiert, die entweder auf beiden Chromosomen die loxp-flankierte, durch Cre-deletierbare-*Cflar*-Gensequenz trugen (fl/fl) oder ein Wildtyp-*Cflar*-Allel

exprimierten (wt/fl). Dargestellt sind der relative Anteil der CD3⁺NK1.1⁺-ILCs sowie die absolute Zellzahl. (C) Hier wurden in der CD3⁺NK1.1⁺-ILC-Population zusätzlich NKp46⁺ Zellen ausgewählt. Als Versuchsgruppe wurden NK^{Δc-FLIP}-Tiere und als Kontrollen NK^{WT}-Tiere (NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel) eingesetzt. Dargestellt sind der relative Anteil der CD3⁺NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs sowie die absolute Zellzahl. (D) Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen der Lin⁻CD122⁺NK1.1⁺NKp46⁺-ILC-Populationen in Cre-positiven Tieren verglichen, die auf jeweils beiden Chromosomen entweder das Wildtyp-Allel (wt/wt; NK^{WT}) oder die loxp-flankierte Gensequenz (fl/fl; NK^{Δc-FLIP}) trugen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten mit Zellen aus der Milz mit 3-5 Mäusen pro Gruppe (total n=7-9) (B,C). Die Analysen im Blut wurden in einem Experiment mit insgesamt 3-5 Tieren pro Gruppe durchgeführt (B,C). In (D) wurden 5 Mäusen je Gruppe eingesetzt. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

4.1.2 Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs in Leber und Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen

Die NKp46⁺-ILCs zirkulieren im Blut und finden sich als gewebsständige Zellen in den unterschiedlichsten Organen (Grégoire et al. 2007; Gasteiger et al. 2015). Um eine mögliche Veränderung der NKp46⁺-ILC-Populationen in anderen Kompartimenten nachzuweisen, wurden Immunzellen in Leber und Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen durchflusszytometrisch analysiert.

Es zeigte sich, dass sowohl der relative Anteil an NK1.1⁺-ILCs als auch deren absolute Zahl in der Leber und im Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen stark reduziert war. In *Cflar*-kompetenten Kontrolltieren war dies nicht der Fall (Abb 4.2 A und B). Zwischen Cre⁻-Mäusen und Cre⁺-Mäusen, die jeweils ein intaktes *Cflar*-Gen besaßen, wurden dagegen keine signifikanten Unterschiede beobachtet (Abb 4.2 B). Dies legt nahe, dass die Expression der Cre-Rekombinase keinen Einfluss auf den Verlust der NK1.1⁺-ILCs in Leber und Knochenmark hat. In den CD3⁺NK1.1⁺-ILCs wurden auch NKp46⁺-Zellen ausgewählt (Abb 4.2 C). Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der CD3⁺NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen sowohl in relativer als auch in absoluter Anzahl.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Cre-vermittelte Inaktivierung des *Cflar*-Gens in NKp46⁺-Zellen zu deren Reduktion in Blut, Milz, Leber und Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen führt.

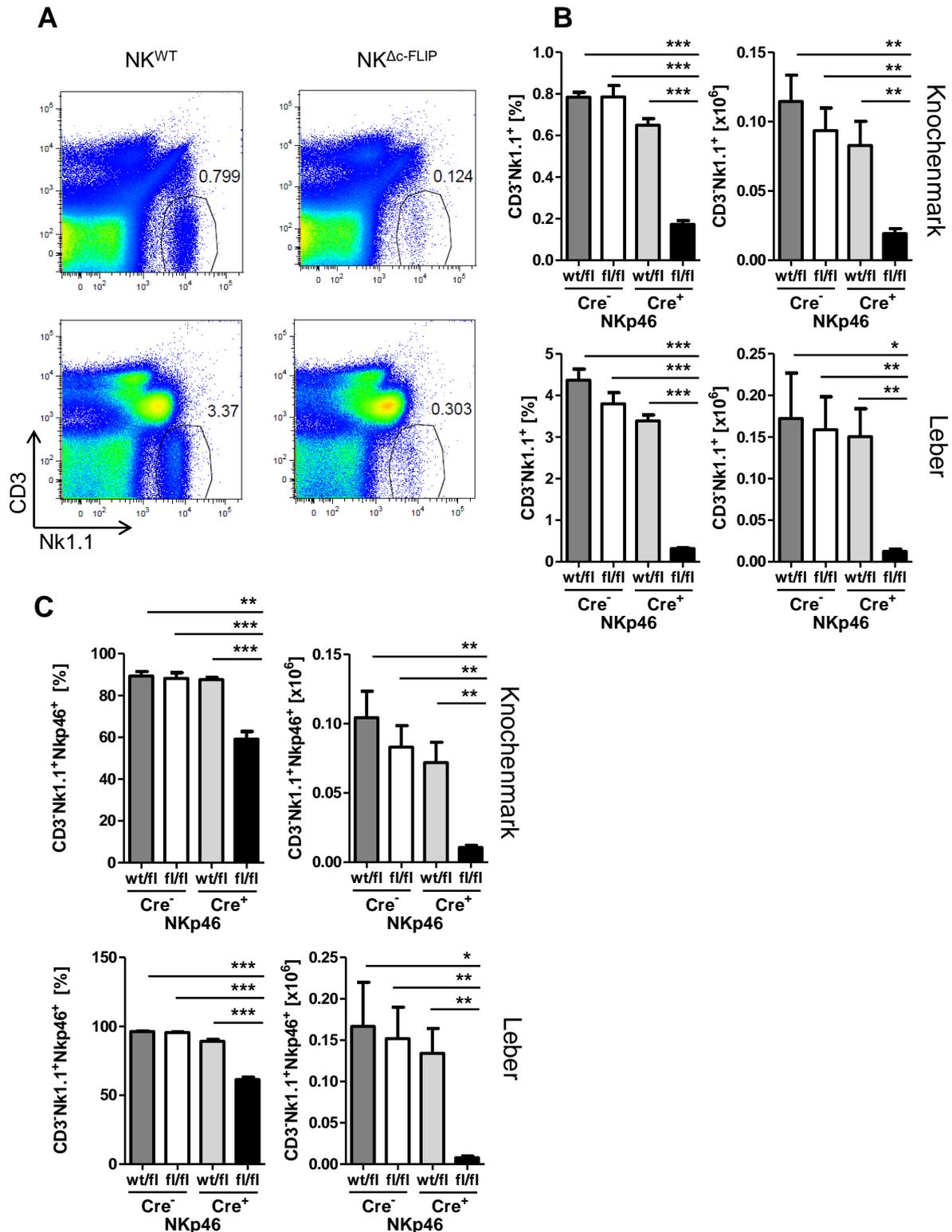


Abb. 4.2: Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs im Knochenmark und Leber der NK^{Δc-FLIP}-Maus

Durchflusszytometrische Analyse der CD3⁺NK1.1⁺-ILC-Population aus dem Knochenmark und der Leber von NK^{Δc-FLIP}-Tieren und NK^{WT}-Tieren. (A) Gezeigt sind repräsentative Dotplots. Die dort angegebenen Zahlen stellen den relativen Anteil der CD3⁺NK1.1⁺-ILCs an der Immunzellpopulation im jeweiligen Organ (oben Knochenmark, unten Leber) dar. (B) Dargestellt sind der relative Anteil der CD3⁺NK1.1⁺-ILCs sowie die absolute Zellzahl im Knochenmark bzw. der Leber in NK^{Δc-FLIP} und NK^{WT}-Mäusen (NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel). (C) Hier wurden in der CD3⁺NK1.1⁺-ILC-Population zusätzlich

NKp46⁺-Zellen ausgewählt. Dargestellt sind der relative Anteil der CD3⁺NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs sowie die absolute Zellzahl in Leber und Knochenmark.

Die Balken repräsentieren Mittelwerte + Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) aus zwei unabhängigen Experimenten mit Zellen aus dem Knochenmark mit 3-5 Mäusen pro Gruppe (total n=7-9) (B,C). Die Zellen aus der Leber wurden in zwei unabhängigen Experimenten mit 4-5 Mäusen pro Gruppe (total n=8-9) gewonnen (B,C). Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

4.1.3 Einfluss des Verlusts von c-Flip in NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs auf T- und B-Zellen

In weiteren Analysen sollte geprüft werden, ob die beobachtete Reduktion der NK1.1⁺NKp46⁺-Zellfrequenz Einfluss auf die Entwicklung und Homöostase von weiteren Immunzellen hat. Für diese Untersuchungen wurden Leukozyten aus Blut, Milz, Leber und Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen (beinhaltend NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl}) entnommen und durchflusszytometrisch analysiert. Zunächst wurden die Frequenz und die absolute Zellzahl der T-Zellen in den genannten Organen untersucht. In Abbildung 4.3 wird die Analysestrategie exemplarisch für die Leukozytenpopulation in der Milz beschrieben. T-Zellen wurden anhand der Expression der Marker CD3 und CD90.2 identifiziert. In dieser Population wurden CD4⁺-T-Helferzellen und CD8⁺-zytotoxische-T-Zellen unterschieden. Es zeigte sich, dass die Frequenzen und absoluten Zahlen von CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen vergleichbar mit denen in NK^{WT}-Mäusen (Abb 4.3 A, B) sind. Zwischen Cre⁻-Mäusen und Cre⁺-Mäusen, mit jeweils mindestens einem Wildtyp-Allel, zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Abb 4.3 B).

Auch bei Einsatz von NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/wt}-Mäusen als NK^{WT}-Kontrollen, zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den T-Zellpopulationen der Tiere mit *Cflar*-Wildtyp-Allel und den NK^{Δc-FLIP}-Mäusen (Abb. 4.3 C). Es ergaben sich somit keine quantitativen Unterschiede im Vorkommen und der Verteilung von CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen zwischen NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und c-Flip-kompetenten Kontrolltieren.

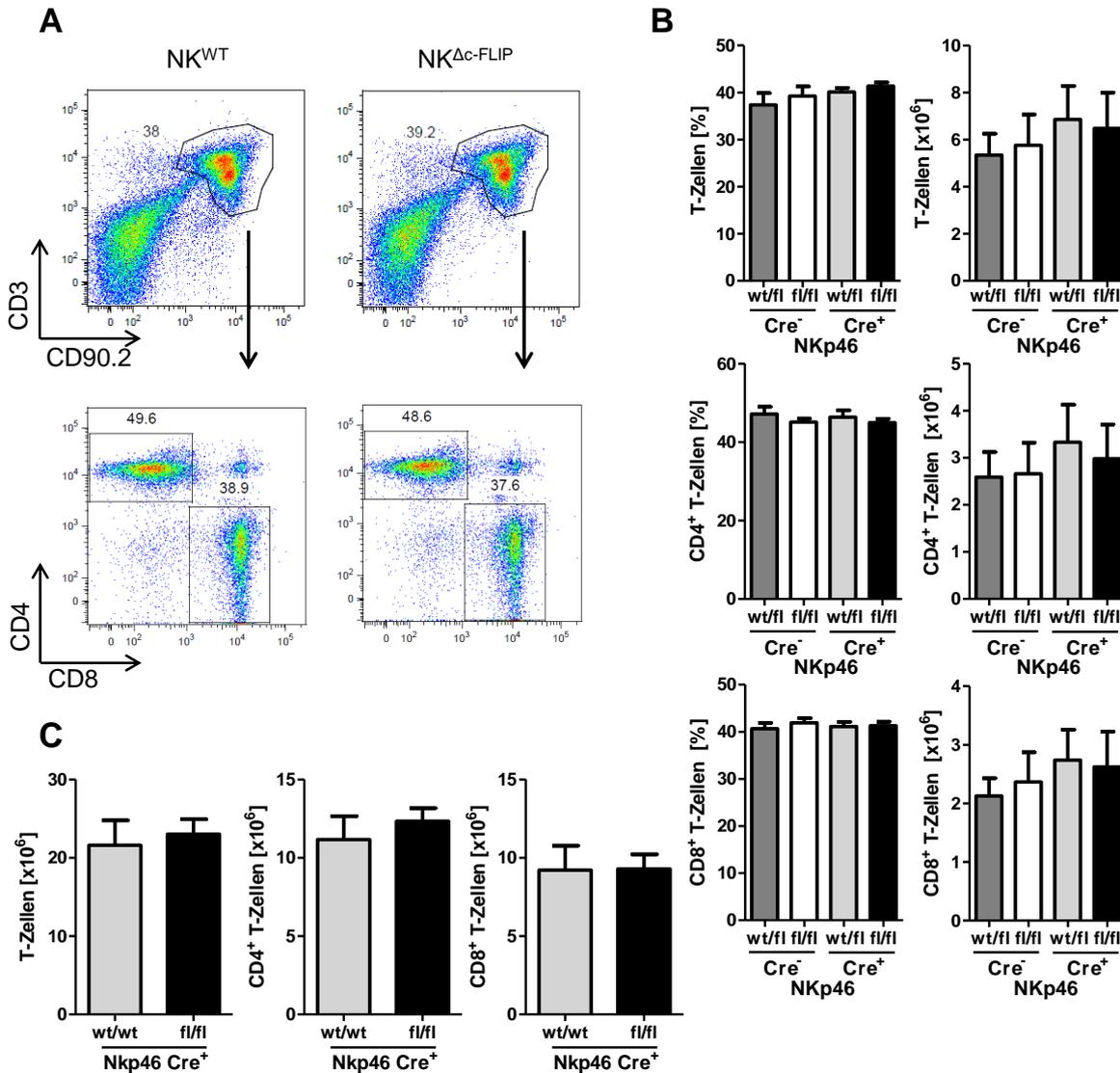


Abb. 4.3: Normale Verteilung der peripheren T-Lymphozyten in der NK^{Δc-FLIP}-Maus

Aus NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen wurden die Milzen entnommen und Leukozyten isoliert. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern gegen die Oberflächenmoleküle CD3, CD90.2, CD4 und CD8 gefärbt und der relative Anteil der CD3⁺CD90.2⁺-T-Zell-Population sowie der relative Anteil CD3⁺CD4⁺-T-Helferzellen und CD3⁺CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. (A) Gezeigt sind repräsentative Dotplots. Die Zahlen in den Dotplots stellen den relativen Anteil der T-Zellen an der Immunpopulation der Milz dar. (B) Als Versuchsgruppe dienen NK^{Δc-FLIP}-Tiere und als Kontrollen NK^{WT}-Tiere (NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel). Die Balkendiagramme repräsentieren den relativen Anteil der jeweiligen T-Zellpopulation sowie die absoluten Zellzahlen in der Milz der Tiere. (C) Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen der T-Zellsubtypen in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen vom Typ NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/wt} verglichen. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe (total n=7-9) dargestellt (B,C). Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Auch im Blut, in der Leber und im Knochenmark wurden die T-Zellpopulationen analysiert. Wie in der Milz wurden die CD3⁺CD90.2⁺-T-Zellen und die Subpopulationen der CD4⁺-T-Zellen und der CD8⁺-T-Zellen betrachtet. Aus der quantitativen Darstellung in Abb. 4.4 ist ersichtlich, dass sich die Frequenzen von CD4⁺-T-Zellen und CD8⁺-T-Zellen in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen im Vergleich zu NK^{WT}-Mäusen auch in Blut, Leber und Knochenmark nicht signifikant unterscheiden. Auch die absoluten T-Zellzahlen in den jeweiligen Organen waren vergleichbar bei allen getesteten Genotypen. In Cre⁻-Mäusen fanden sich T-Zellen in gleicher Menge wie in Cre⁺-Mäusen, die ein intaktes *Cflar*-Gen besitzen (Abb 4.4). Somit lassen sich bezüglich der T-Zellpopulationen der NK^{Δc-FLIP}-Maus in verschiedenen Organen keine quantitativen Unterschiede zu Kontrolltieren erkennen. Der Verlust von c-Flip in NKp46⁺-Zellen hat also keinen Einfluss auf die Verteilung der T-Zellen.

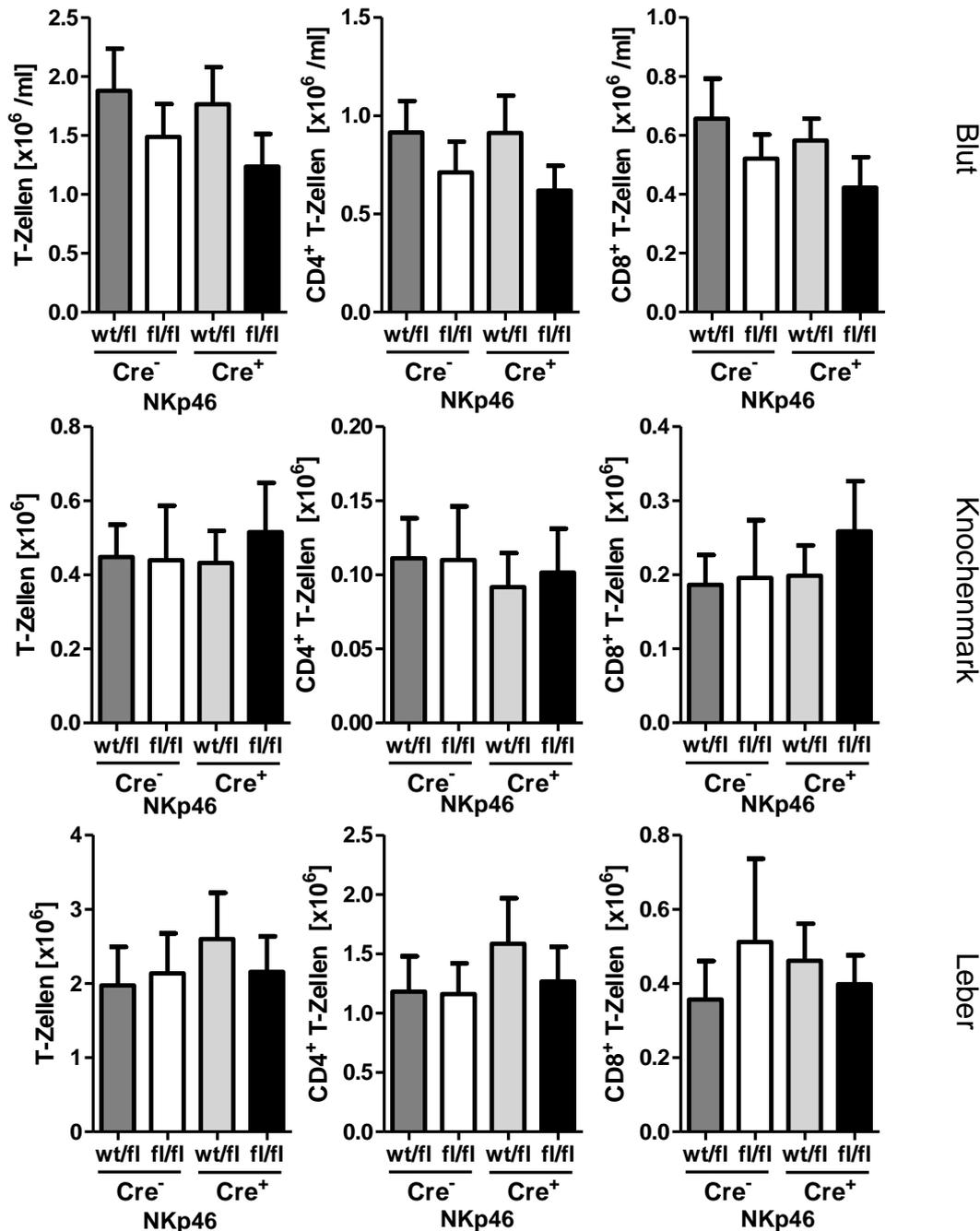


Abb. 4.4: Unveränderte Anzahl von T-Lymphozyten in Leber, Knochenmark und Blut der $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Maus

Aus NK^{WT} -Mäusen und $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen wurden Blut, Knochenmark und Leber entnommen und die $CD3^+CD90.2^+$ -T-Zell-Population sowie der $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellpopulationen durchflusszytometrisch analysiert. Auf der Basis der relativen Daten und der ermittelten Gesamtleukozytenzahl pro Organ (im Fall des peripheren Blutes pro ml) wurde die absolute Anzahl der T-Zellpopulationen berechnet und hier dargestellt. Als Versuchsgruppe dienen $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Tiere und als Kontrollen NK^{WT} -Tiere ($NKp46-Cre^+ \times c-FLIP^{wt/fl}$, $NKp46-Cre^- \times c-FLIP^{wt/fl}$ und $NKp46-Cre^- \times c-FLIP^{fl/fl}$ mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel) um mögliche Einflüsse der Cre-Expression auf die Immunzellzusammensetzung zu erfassen. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SEM der zusammengefassten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe (total $n=3-9$) für Zellen aus Knochenmark und Leber. Die Analysen im Blut wurden in einem Experiment mit insgesamt 3-5 Tieren pro Gruppe durchgeführt. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Die Vergleichbarkeit der T-Zellzahlen zwischen $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen und Kontrolltieren ist jedoch kein Nachweis dafür, dass das Fehlen der $NK1.1^+NKp46^+$ -ILCs nicht die Funktion der T-Lymphozyten beeinflusst. Um den Aktivierungs- und Differenzierungsgrad der T-Lymphozyten zu beurteilen, wurden in den Subpopulationen der $CD4^+$ -T-Zellen und $CD8^+$ -T-Zellen weitere funktionelle Marker betrachtet (Abb 4.5). Der Oberflächenmarker CD44 (ein Zelladhäsionsmolekül) wird auf Zellen hochreguliert, die bereits Antigen-Kontakt hatten. Man findet CD44 auf T-Zellen, die aktiviert sind oder eine Gedächtnisfunktion besitzen (Baaten et al. 2013). Der Oberflächenmarker CD62L (ein L-Selektin zur Zelladhäsion) wird von zentralen Gedächtnis-T-Zellen exprimiert. Seine Abwesenheit erlaubt die Differenzierung der Effektor-Gedächtnis-T-Zellen (Sallusto et al. 1999; Baaten et al. 2013). Eine T-Zelle, die wenig CD44 und viel CD62L exprimiert, ist eine naive T-Zelle. Da sich auch hier keine Unterschiede zwischen $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Maus und den jeweiligen Kontrollen zeigen wie in Abbildung 4.5 dargestellt, lässt sich schlussfolgern, dass durch die Deletion der c-Flip-Expression in $NKp46^+$ -ILCs und die signifikante Reduktion an $NKp46^+$ -Zellen die T-Zellfunktion nicht wesentlich beeinflusst ist. Weiterführende Experimente wie funktionelle Assays mit T-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt.

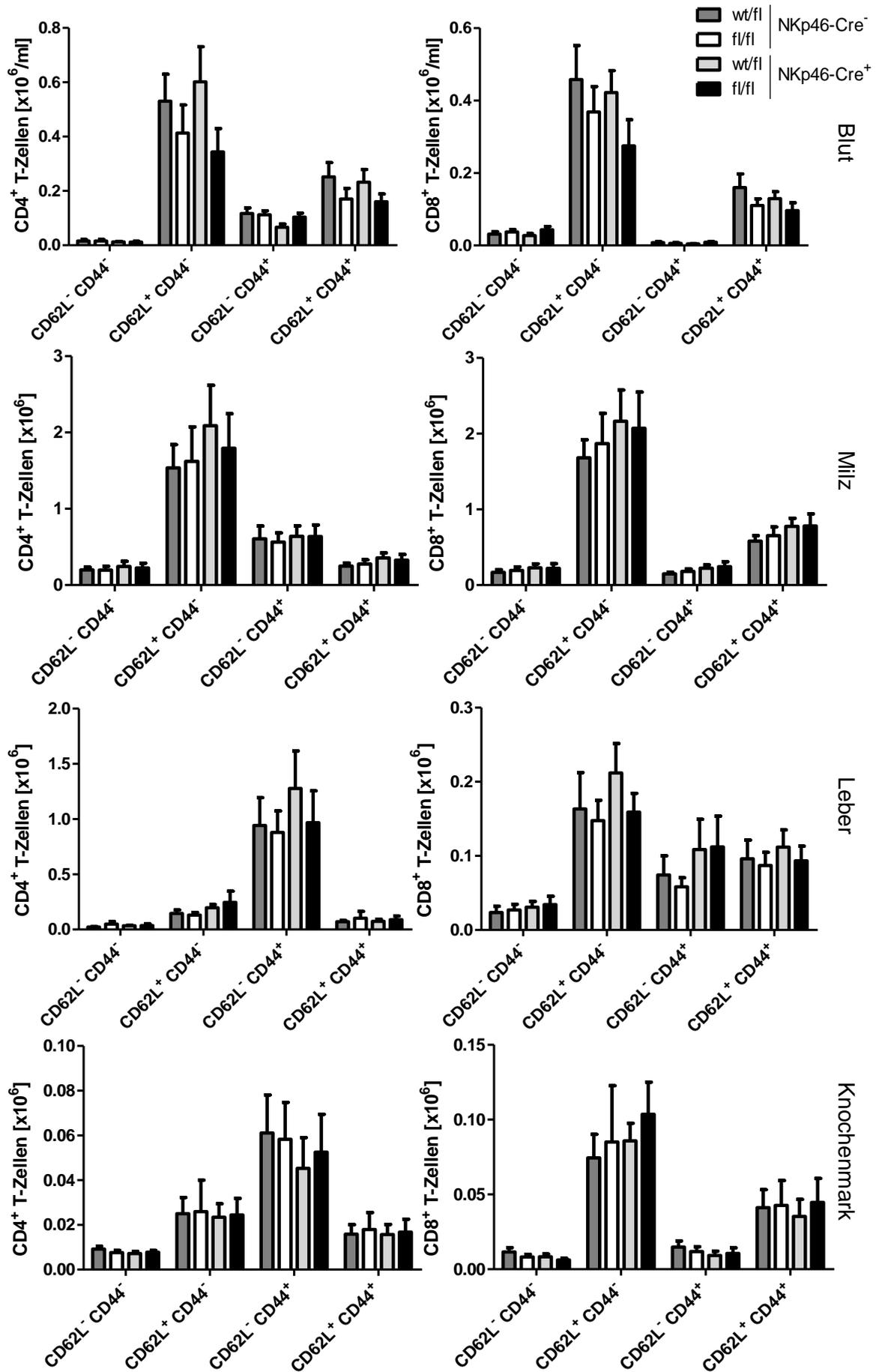


Abb. 4.5: Differenzierungsstatus von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen sind in der NK^{Δc-FLIP}-Maus unverändert

Differenzierungsgrad und Funktionsstatus der T-Zellpopulationen in Blut, Milz, Leber und Knochenmark von NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen wurden durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurde in den Populationen der CD3⁺CD90.2⁺CD4⁺-T-Zellen und CD3⁺CD90.2⁺CD8⁺-T-Zellen die Expression der Marker CD44 und CD62L analysiert. Es wurden NK^{Δc-FLIP}-Mäuse und als Kontrollen NK^{WT}-Mäuse (NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl} mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel) verwendet. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SEM der zusammengefassten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten (Milz, Leber Knochenmark) mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe (total n=7-9). Aus den Blutproben wurde ein Experiment gezeigt mit jeweils 3-5 Mäusen pro Gruppe (total n=3-5). Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines Nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Ebenfalls zur lymphatischen Reihe gehören die B-Zellen. Auch diese Population wurde hinsichtlich ihres Vorkommens und der Verteilung in unterschiedlichen Organen untersucht. In den aus Milz, Leber, Knochenmark gewonnenen Leukozytensuspensionen sowie im Blut wurden B-Zellen durch die Expression des Markers CD19 identifiziert. Wie in Abb. 4.6 dargestellt, sind die Frequenzen und die absolute Zahl von B-Zellen in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen im Vergleich zu NK^{WT}-Mäusen (beinhalten NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/fl}, NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{wt/fl} und NKp46-Cre⁻ x c-FLIP^{fl/fl}) unverändert. Auch bei Einsatz von NKp46-Cre⁺ x c-FLIP^{wt/wt}-Mäusen als NK^{WT}-Kontrollen wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den B-Zellzahlen in der Milz der NK^{WT}-Mäuse und der NK^{Δc-FLIP}-Mäuse festgestellt (Abb. 4.6 C). Zusammenfassend lassen die Analysen der T- und B-Zellpopulation den Rückschluss zu, dass weder Entwicklung noch Homöostase von T- und auch B-Zellen durch die selektive Deletion der c-Flip-Expression in NKp46⁺-Zellen beeinflusst wird. Demnach führt die Deletion von c-Flip in NKp46⁺-Zellen zum isolierten Verlust von NKp46⁺-ILCs bei intakter B- und T-Zellanzahl.

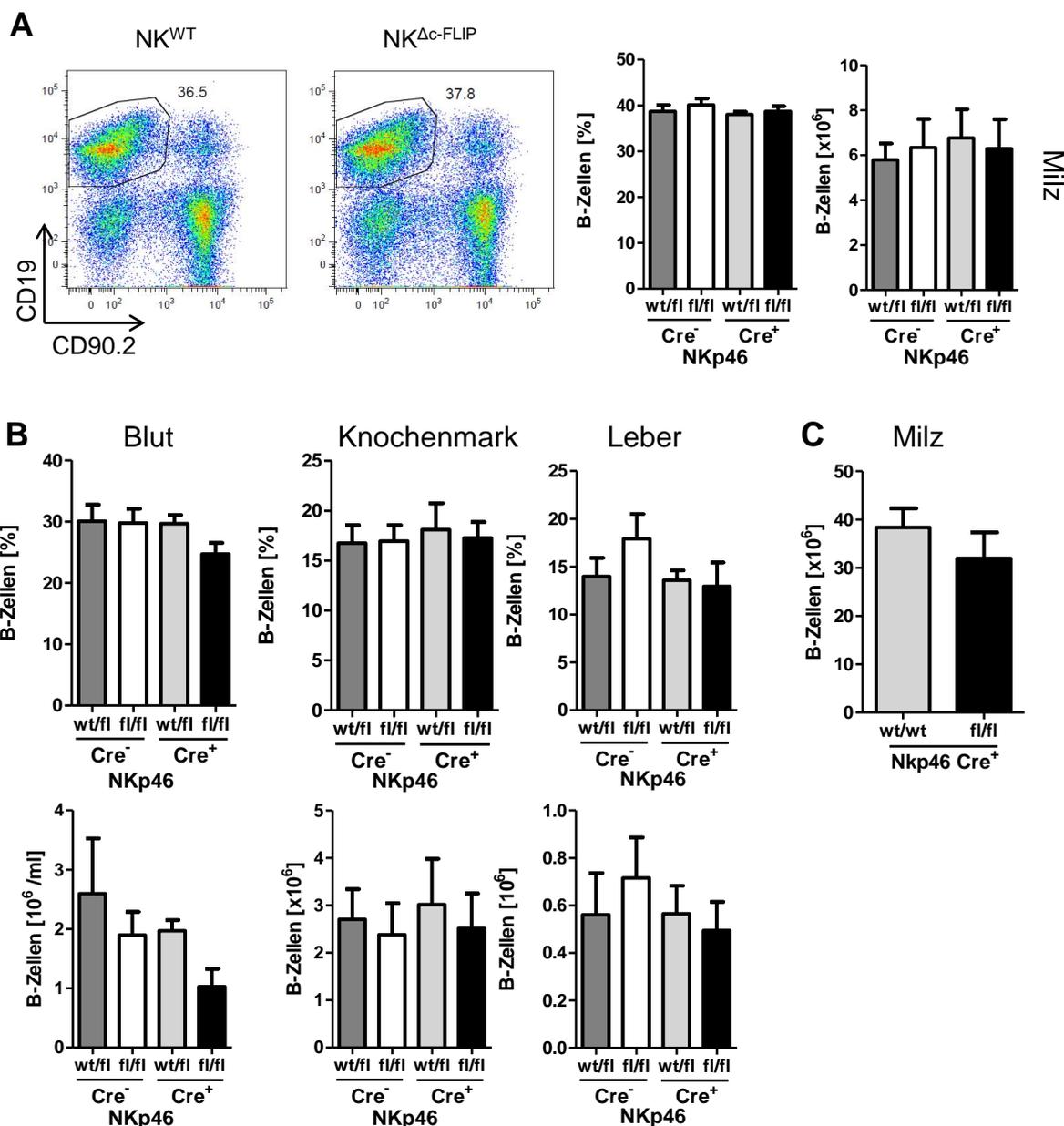


Abb. 4.6: B-Zellzahlen sind unverändert in $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Maus

Leukozyten aus Milz, Leber, Knochenmark und dem Blut von NK^{WT} -Mäusen und $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer $CD19^+$ - und $CD90.2^+$ -Expression untersucht. (A) Gezeigt sind repräsentative Dotplots in denen der relative Anteils der $CD19^+$ -B- Zellen gekennzeichnet ist. (A, B) Als Versuchsgruppe dienen $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Tiere und als Kontrollen NK^{WT} -Tiere ($NKp46-Cre^+ \times c-FLIP^{wt/fl}$, $NKp46-Cre^- \times c-FLIP^{wt/fl}$ und $NKp46-Cre^- \times c-FLIP^{fl/fl}$ mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel). Dargestellt sind die Frequenz sowie die B-Zellanzahl in (A) der Milz, (B) der Leber, dem Knochenmark und dem Blut. (C) Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen der B-Zellen der Milz in $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen und NK^{WT} -Mäusen vom Typ $NKp46-Cre^+ \times c-FLIP^{wt/wt}$ verglichen. Gezeigt sind zusammengefasste Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe (total $n=7-9$) als Mittelwerte + SEM,. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.1.4 Auswirkungen des Verlusts von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs auf Zellen der myeloischen Linie

In der neu generierten Maus NK^{Δc-FLIP} wurden nicht nur die Zellen der lymphatischen Reihe, sondern auch die myeloischen Zellen untersucht. Mit Hilfe Zelltyp-spezifischer Marker wurden die relativen und absoluten Zahlen von DCs, Makrophagen, Monozyten und Granulozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Die DCs wurden durch das Vorhandensein von MHC-II und CD11c charakterisiert. Makrophagen und Monozyten wurden über den Marker F4-80 detektiert. Neutrophile Granulozyten wurden durch den Marker CD11b und die hohe Expression von Gr-1 definiert.

Die in Abb. 4.7 A dargestellten *Dotplots* zeigen repräsentative Beispiele für die Frequenzen der DCs, Makrophagen und Monozyten in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen. Die Frequenzen und die absoluten Zahlen dieser Zellen zeigten keine Unterschiede zwischen NK^{Δc-FLIP}- und NK^{WT}-Mäusen (Abb. 4.7 B, C). Der relative Anteil und die Anzahl von CD11⁺Gr1⁺-Granulozyten war vergleichbar zwischen beiden Genotypen.

Zusammenfassend ergaben die durchflusszytometrischen Analysen zur Zusammensetzung der Immunzellpopulationen, dass in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen ein selektiver Verlust von NKp46⁺-ILCs bei ansonsten unverändertem Immunphänotyp von T-Zellen, B-Zellen und myeloischen Zellen vorliegt.

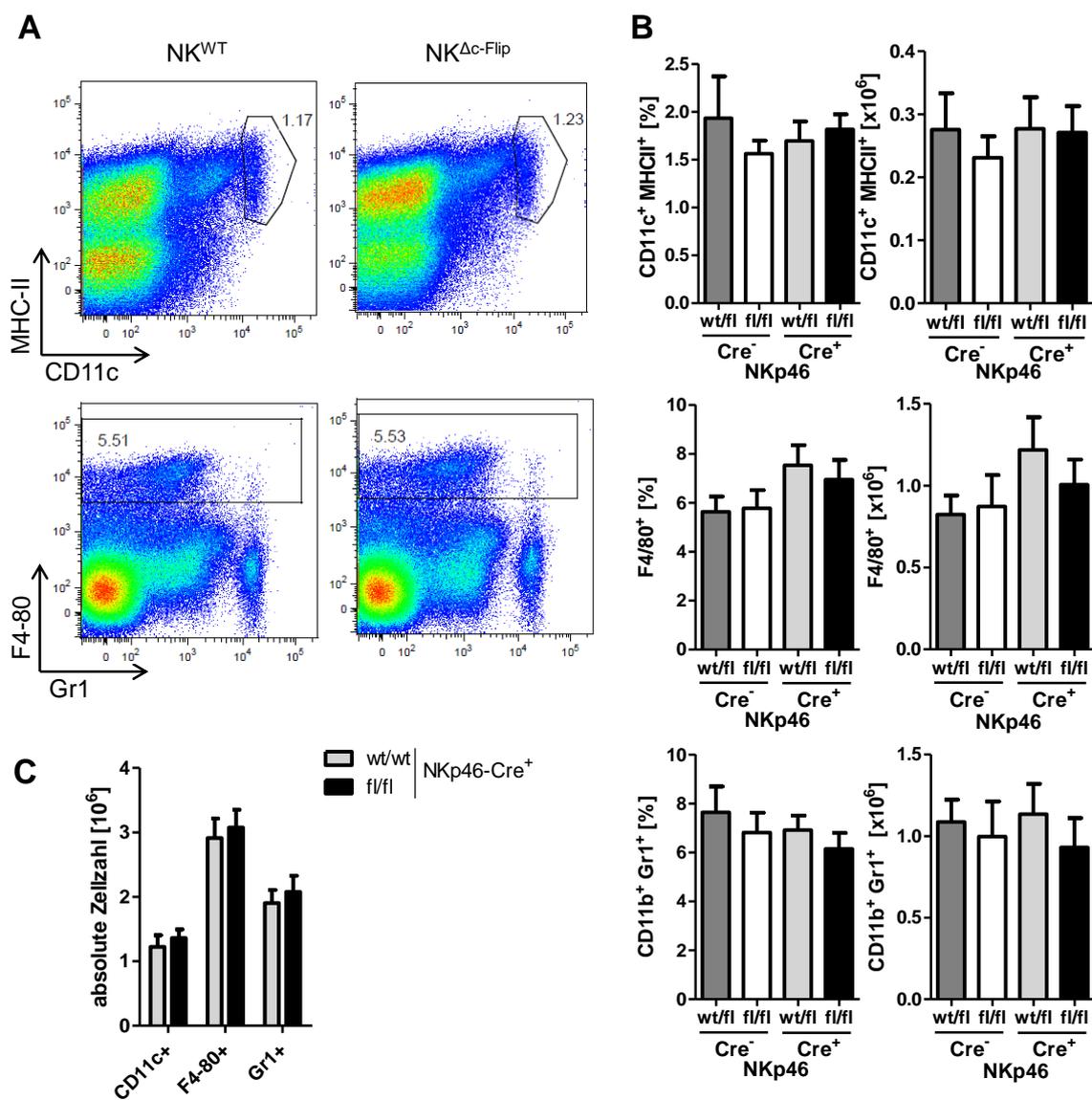


Abb. 4.7: Die Anzahl myeloider Zellen ist unverändert in $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen

Aus NK^{WT} -Mäusen und $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen wurde die Milzen entnommen und die Leukozyten analysiert. (A) Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern für die Oberflächenmoleküle MHC-II, CD11c, F4-80, CD11b und Gr-1 gefärbt. Gezeigt sind repräsentative Dotplots. Die angegebenen Zahlen stellen den Prozentsatz der jeweiligen Zellpopulation in der Milz dar. (B) Dargestellt sind der relative Anteil der dendritischen Zellen ($MHC-II^+CD11c^+$), Makrophagen und Monozyten ($F4-80^+$) und neutrophilen Granulozyten ($CD11b^+Gr1^+$) sowie die absolute Zellzahlen der jeweiligen Populationen in der Milz. Als Versuchsgruppe dienen $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Tiere und als Kontrollen NK^{WT} -Tiere ($NKp46-Cre^+ \times c-FLIP^{wt/fl}$, $NKp46-Cre^- \times c-FLIP^{wt/fl}$ und $NKp46-Cre^- \times c-FLIP^{fl/fl}$ mit mindestens einem intaktem *Cflar*-Allel). (C) Zusätzlich wurden die absoluten Zellzahlen der myeloiden Zellen der Milz in $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen und NK^{WT} -Mäusen vom Typ $NKp46-Cre^+ \times c-FLIP^{wt/wt}$ verglichen. Gezeigt sind jeweils Mittelwerte + SEM, zusammengefasste Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit je 3-5 Mäusen pro Gruppe (total $n=7-9$) (B, C). Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests und ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.2 Einfluss der c-Flip-Inaktivierung auf die Entwicklung von NKp46⁺-ILCs

4.2.1 Analyse der ILC-Vorläufer im Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen

Bisher konnte gezeigt werden, dass durch die Inaktivierung der c-Flip-Expression in NKp46⁺-Zellen die Frequenz und absolute Zahl reifer ILCs im Knochenmark und in den peripheren Organen stark reduziert sind, während andere Immunzellpopulationen nicht betroffen sind. Durch weitere Untersuchungen sollte geklärt werden, ob die Verringerung der NKp46⁺-ILCs auf eine Beeinträchtigung der ILC-Entwicklung im Knochenmark zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden ILC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Dazu wurden zunächst Zellen, die einen der folgenden Linien-spezifischen Marker exprimieren, ausgeschlossen: CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, Ter119. Anhand fehlender Linien-spezifischer Marker, Abwesenheit von CD11b und der gleichzeitigen Expression von CD122 wurden ILC1-Vorläufer identifiziert. (Rosmaraki et al. 2001) (Abb. 4.8). Deren frühestes Entwicklungsstadium ist NK1.1⁻NKp46⁻ (doppelt negativ; Vorläufer) gefolgt vom NK1.1⁺NKp46⁻ Stadium (einfach positiv, früh unreif) und dem NK1.1⁺NKp46⁺ Stadium (doppelt positiv, spät unreif) (Yu et al. 2013; Sun und Lanier 2011). Wie in Abbildung 4.8 dargestellt, ist in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen zu beobachten, dass die Vorläuferzellen zwar noch das NK1.1⁺NKp46⁻ Stadium erreichen, im nächsten Reifungsschritt (NK1.1⁺NKp46⁺) jedoch deutlich weniger Zellen vorhanden sind. In diesem Stadium fehlt durch Aktivierung des NKp46-Promotors und die damit einhergehende Expression von Cre erstmalig c-Flip in den Zellen.

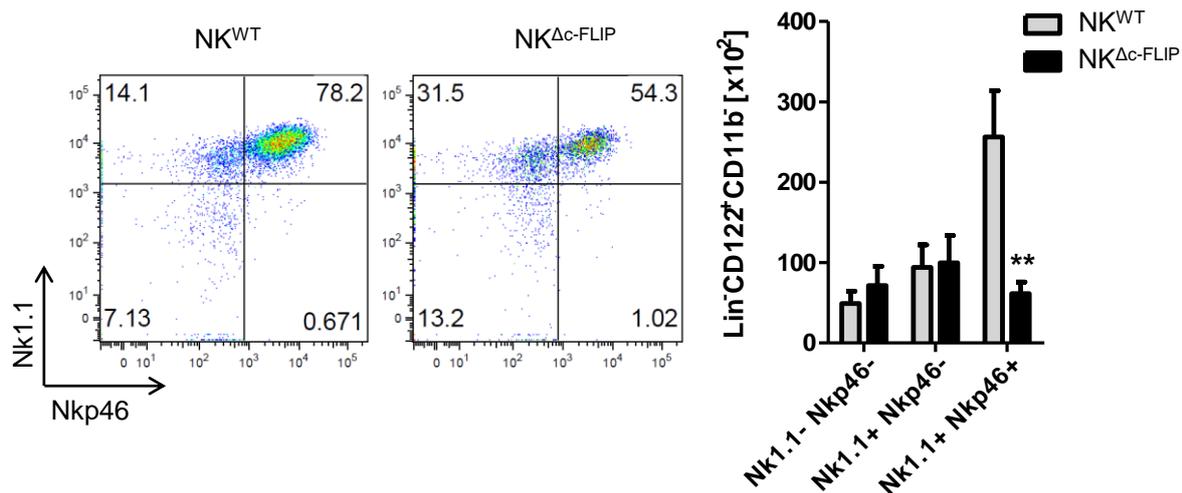


Abb. 4.8: c-Flip ist essentiell für die Entwicklung von unreifen NKp46⁺-ILCs aus Vorläuferzellen
 Aus NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen wurde das Knochenmark entnommen und die Leukozyten isoliert. Die Zellen wurden mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern für die Oberflächenmoleküle CD122, CD11b, NK1.1, NKp46 und den Linien-spezifischen Markern CD3, CD4, CD8, CD19, Gr-1, Ter119 gefärbt. In der Lineage-Marker⁻CD122⁺CD11b⁻-Population wurde mithilfe der Marker NK1.1 und NKp46 die Einteilung in ILC-Vorläufer (NK1.1⁻NKp46⁻), frühe unreife ILC (NK1.1⁺NKp46⁻) und späte unreife ILC (NK1.1⁺NKp46⁺) vorgenommen. Gezeigt sind repräsentative Dotplots. Die Zahlen in den Dotplots stellen den relativen Anteil an der Immunpopulation Lineage⁻CD122⁺CD11b⁻ dar. Das Balkendiagramm zeigt die zusammengefassten Daten aus zwei unabhängigen Experimenten mit jeweils 4-5 Mäusen pro Gruppe (total n=8-9) als Mittelwerte + SEM. Die statistische Analyse erfolgte unter Anwendung eines nicht-parametrischen zweiseitigen Mann-Whitney-U-Tests, * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001

4.2.2 Die Inaktivierung von c-Flip in NKp46⁺-Vorläuferzellen führt zum Abbruch der ILC-Entwicklung *in vitro*

Die anti-apoptotische Wirkung von c-Flip beruht auf der Blockierung der Caspase 8-Aktivierung beim extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion (Thome und Tschopp 2001). In T-Zellen führt ein Verlust der c-Flip-Expression zur drastischen Reduktion der Zellzahl (Zhang 2005). In B-Zellen verhindert die Anwesenheit von c-Flip am Todesrezeptorkomplex die Fas- oder TRAIL-induzierte Apoptose (Wang et al. 2000; Hennino et al. 2000). Auch in DCs (Rescigno et al. 2000), Makrophagen (Perlman et al. 1999) und Granulozyten (Huang et al. 2010) wurde der Schutz vor Apoptose durch Anwesenheit von c-Flip beschrieben. Durch den nachgewiesenen Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs bei Inaktivierung der c-Flip-Expression ist denkbar, dass der Schutz vor der Caspase 8-vermittelten Apoptose in Vorläuferzellen wichtig für die Entwicklung der NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs ist.

Eine Vielzahl von Faktoren können Apoptose von Zellen im Knochenmark auslösen. Zur genaueren Analyse wurde ein *in vitro*-Differenzierungssystem zur Generierung von

NKp46⁺NK1.1⁺-ILCs aus ILC-Vorläufern auf der Grundlage bereits publizierter Protokolle (Luther et al. 2011; Constantinides et al. 2014) in unserem Labor etabliert.

Für die Gewinnung von ILC-Vorläuferzellen wurde das Knochenmark aus Ober- und Unterschenkelknochen von NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen isoliert und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Durch magnetische Depletion von CD19⁺, Ly6G⁺, Ter119⁺ Zellen erfolgte eine Anreicherung von CD122-exprimierenden Zellen. Die verbleibenden Zellen wurden mit Antikörpern für die Oberflächenmoleküle CD122, NK1.1 und Linien-spezifischen Markern für T-Zellen (CD3, CD8, CD4) gefärbt. Zur Isolation der ILC-Vorläufer wurden die gefärbten Zellen mit Hilfe des FACS Vantage SE DiVA nach folgender *Gating*-Strategie sortiert: ILC-Vorläufer wurden durch die fehlende Expression aller Linien-spezifischen Marker (Lineage⁻) und der Expression der IL-2Rβ-Kette (CD122⁺) identifiziert. Aus dieser Population wurden anschließend Zellen sortiert, die entweder den NK-Zellmarker NK1.1 exprimierten oder nicht. Die NK1.1⁻-Zellen stellen die ILC-Vorläufer dar.

Die sortierten Vorläuferzellen wurden auf bestrahlte OP9-Stroma-Zellen ausgesät. Bei den OP9-Stroma-Zellen handelt es sich um adhärenzte Zelllinie, die in hämatopoetischen Stammzellkulturen Wachstums- und Überlebenssignale bereitstellt (Nakano et al. 1994). Die Vorläuferzellen wurden unter Zugabe von SCF, Flt-3 Ligand, IL-7, IL-15, 1-Thioglycerol und Primocin für 9 Tage kultiviert (Luther et al. 2011). An Tag 9 wurden die Zellen aus der Kultur entnommen und durchflusszytometrisch auf die Expression von NKp46 untersucht.

Wie in Abb. 4.9 dargestellt, differenzierten die isolierten Lin⁻CD122⁺NK1.1⁻NKp46⁻-ILC-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark von NK^{WT}-Mäusen innerhalb von 9 Tagen zu NKp46⁺-Zellen. Im repräsentativen *Dotplot* ist der relative Anteil der CD45⁺NKp46⁺-Zellpopulation dargestellt. Die quantitative Analyse zeigte, dass in Proben aus NK^{WT}-Mäusen die Anzahl von NKp46⁺-ILCs im Verhältnis von Tag 0 zu Tag 9 deutlich zunahm. Auf die gleiche Weise wurden auch die Vorläuferzellen aus NK^{Δc-Flip}-Mäusen *in vitro* behandelt. Hier zeigte sich sowohl im *Dotplot* als auch in der quantitativen Darstellung keine nennenswerte Entwicklung von NKp46⁺-ILCs (Abb. 4.9). Die Bildung reifer NKp46⁺-ILCs aus c-Flip-defizienten Vorläuferzellen war stark eingeschränkt, was die massive Reduktion peripherer ILCs in NK^{Δc-Flip}-Mäusen erklärt.

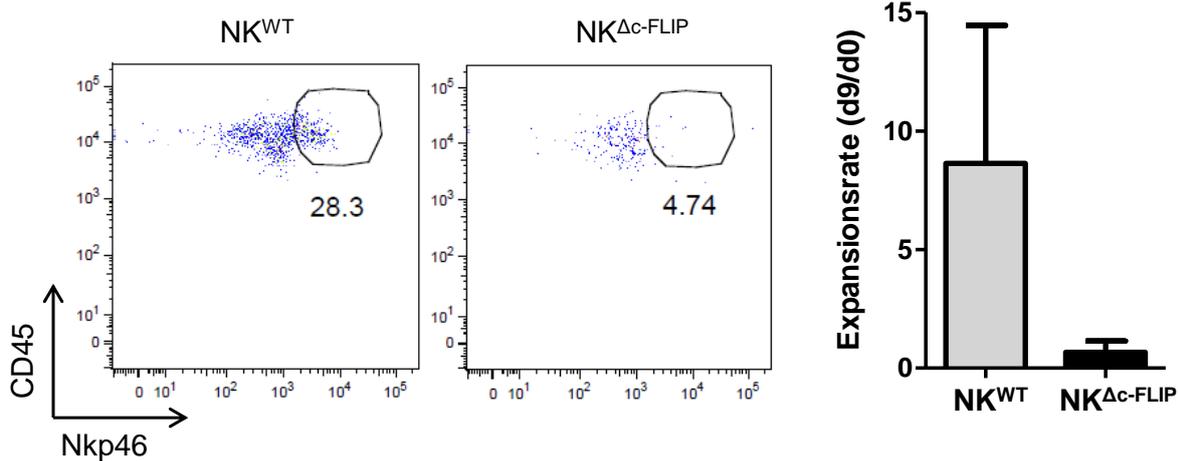


Abb. 4.9: Verlust von c-Flip verringert das Überleben von NKp46⁺-ILCs *in vitro*

Aus dem Knochenmark von NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen wurden Leukozyten isoliert. Die Zellen wurden mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern nach den Oberflächenmolekülen in eine Lin⁻CD122⁺NK1.1⁻NKp46⁻-Zell-Population per Zellsorter selektiert. Diese ILC-Vorläufer wurden *in vitro* auf eine OP9-Stroma-Kultur gegeben und für 9 Tage unter der Zugabe von SCF, Flt3, IL-15 und IL-7 kultiviert. An Tag 9 erfolgte eine Analyse der ILCs mittels Durchflusszytometrie. Es erfolgte eine Auswahl der CD45⁺NKp46⁺-Zellpopulation und eine Ermittlung der absoluten Zellzahlen aus den Kulturen. Die Expansionsrate (Zellzahl Tag 9 (d9) / Zellzahl Tag 0 (d0)) zeigt das Anwachsen der NKp46⁺ ILC darzustellen. Gezeigt wird ein repräsentativer Dotplot. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SEM, gezeigt werden die zusammengefassten Daten aus 5 unabhängigen Experimenten mit jeweils 1 Probe pro Gruppe (total n=5).

4.2.3 Inhibition der Caspase-abhängigen Apoptose in NKp46⁺-ILC-Vorläufern

Die anti-apoptotische Wirkung von c-Flip wird durch die Inhibition der autokatalytischen Aktivierung nach Dimerisierung von Procaspase-8 (Thome und Tschopp 2001; Zhang 2005; Huang et al. 2010) charakterisiert (siehe Abb 2.3). Jedoch aktiviert c-Flip in Jurkat-T-Zellen die NFκB- und Erk-Signalwege und steuert so deren Proliferation (Thome und Tschopp 2001; Zhang 2005; Huang et al. 2010). Um zwischen den Beitrag Caspase-abhängiger und –unabhängiger Signalgebungsprozesse zur ILC-Entwicklung unterscheiden zu können, wurden NK1.1⁺NKp46⁺-ILC-Vorläufer aus dem Knochenmark von NK^{WT}-Mäusen und NK^{Δc-FLIP}-Mäusen isoliert und für 9 Tage in An- bzw. Abwesenheit des Caspase-Inhibitors QVD mit OP9-Stromazellen kultiviert. An Tag 9 erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der ILCs. Es wurden die absoluten Zellzahlen der NKp46⁺-ILCs aus der unbehandelten Kontrolle und der QVD-behandelten Kultur bestimmt und ins Verhältnis gesetzt (Expansionsrate). In Abb. 4.10 ist dargestellt, dass die Differenzierung zu NKp46⁺-ILCs aus c-Flip-defizienten ILC-Vorläufern durch die Gabe des Casapase-Inhibitors

deutlich gesteigert wurde. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibierung der Casapse-Aktivität in Wildtyp-Vorläuferzellen kaum Wirkung, da ähnlich viele ILCs aus Caspase-Inhibitor behandelten und unbehandelten Kulturen generiert wurden. Durch die fehlende Expression von c-Flip in $NK^{\Delta c-FLIP}$ -Mäusen entfällt der Überlebensschutz der ILC-Vorläufer. Bei Einsatz des Pan-Caspase-Inhibitors (QVD) wurden die Caspase-vermittelten Apoptose-Wege der Zellen blockiert. Dies lässt den Rückschluss zu, dass c-Flip hauptsächlich Caspase-vermittelte Apoptose in ILC-Vorläufern inhibiert und dadurch die Differenzierung zu reifen $NKp46^+$ -ILCs ermöglicht.

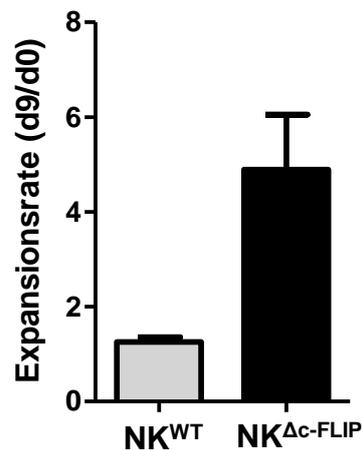


Abb. 4.10: Der Caspase-Inhibitor QVD ermöglicht das Überleben von c-Flip-defizienten $NKp46^+$ -ILCs *in vitro*

$Lin^-CD122^+NK1.1^-NKp46^-$ -Zellen wurden aus dem Knochenmark NK^{WT} -Mäusen und $NK^{\Delta c-Flip}$ -Mäusen isoliert und für 9 Tage mit OP9-Zellen in An- beziehungsweise Abwesenheit des Caspase-Inhibitors QVD kultiviert. An Tag 9 erfolgte eine Analyse der Frequenz und absoluten Zahl von $NKp46^+$ -ILCs mittels Durchflusszytometrie. Aus der absoluten Anzahl von $NKp46^+$ -Zellen unter QVD-Behandlung im Verhältnis mit der unbehandelten Kontrolle wurde die Expansionsrate bestimmt (Zellzahl Tag 9 (d9) / Zellzahl Tag 0 (d0)). Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SEM, gezeigt werden die zusammengefassten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten mit jeweils 1 Probe pro Gruppe (total n=3).

4.2.4 Blockade von Todesrezeptoren in NKp46⁺-ILC-Vorläufern

Der Caspase 8-abhängige, extrinsische Weg der Apoptoseinduktion wird durch Signale von sogenannten „Todesrezeptoren“ ausgelöst (Lavrik 2005). Durch ihre Fähigkeit Todesrezeptorliganden wie zum Beispiel TNF- α zu produzieren (Vonarbourg et al. 2010; Klose et al. 2014; Vivier et al. 2008), befinden sich ILCs in einem Zytokinmilieu, das Apoptose fördern oder hervorrufen kann. Daher stellten sich die folgenden Fragen: Spielt die Apoptoseinduktion durch Todesrezeptoren eine Rolle in der Entwicklung von NKp46⁺-ILCs? Welche Funktion hat c-Flip beim Schutz vor Todesrezeptor-induzierter Apoptose?

Um genauer zu erfahren, ob und welche Todesrezeptoren relevant für die Entwicklung von NKp46⁺-ILCs sind, wurden Experimente mit blockierenden Antikörpern gegen Liganden der Todesrezeptoren durchgeführt. Dazu wurden Lin⁻CD122⁺NK1.1⁻NKp46⁻-ILC-Vorläufern aus Einzelzellsuspensionen des Knochenmarks von NK ^{Δ c-FLIP}-Mäusen isoliert und auf OP-Stromazellen kultiviert. Es wurden jeweils blockierende Antikörper gegen die Todesrezeptorliganden Fas-Ligand, TRAIL und TNF- α zur Kultur gegeben. Als Kontrolle wurde ein Teil der Zellen in einer separaten Kultur mit den Isotyp-Kontrollen der Antikörper inkubiert. Am Tag 9 erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Frequenz von NKp46⁺-ILCs in der Kultur. In Abb. 4.11 wird die Quantifizierung der absoluten NKp46⁺-Zellen aus den jeweils mit Antikörpern gegen Todesrezeptoren behandelten Kulturen dargestellt. Unter Zugabe von anti-TNF- α war eine signifikant höhere Differenzierungsrate von NKp46⁺-ILCs zu verzeichnen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass TNF- α die Apoptose von ILC-Vorläufern fördert. Die TNF- α -induzierte-Apoptose wird physiologisch durch c-Flip blockiert. Mit dem Wegfallen des Schutzes von c-Flip sterben die Zellen. *In vitro* können jedoch auch in Abwesenheit der c-Flip-Expression NKp46⁺-ILCs durch Blockade des TNF- α -Signals gebildet werden. Unter Blockade von Fas-Ligand und TRAIL ließ sich dies nicht in vergleichbarem Ausmaß erreichen. Dennoch ist eine Tendenz zur vermehrten Generierung von NKp46⁺-ILCs im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen (Abb 4.11).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass c-Flip die TNF- α -vermittelte Apoptose in einem frühen Stadium der Reifung von NKp46⁺-ILCs inhibiert.

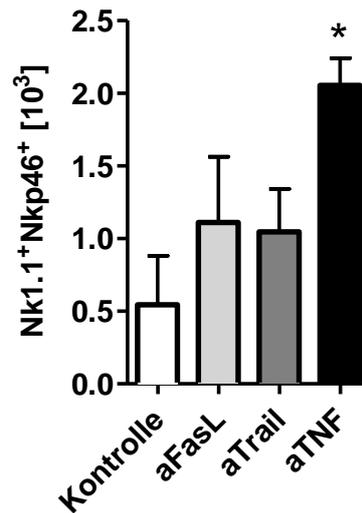


Abb. 4.11: c-Flip schützt ILC-Vorläufer vor TNF- α -induzierter Apoptose *in vitro*

Lin⁻CD122⁺Nkp46⁻NK1.1⁻-Leukozyten wurden aus dem Knochenmark von NK ^{Δ c-FLIP}-Tieren isoliert und für 9 Tage kultiviert. Zur Kultur wurden jeweils blockierende Antikörper gegen Fas-Ligand (aFasL), TRAIL (aTrail), TNF- α (aTNF) oder Isotyp-Kontrollen als unbehandelte Probe (Kontrolle) gegeben. An Tag 9 wurden die Frequenzen der NK1.1⁺Nkp46⁺-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt und die absoluten Zellzahlen berechnet. Die Balken repräsentieren Mittelwerte + SEM, gezeigt werden die zusammengefassten Daten aus 3 unabhängigen Experimenten, * p<0,05, Paardifferenz-Test.

5 Diskussion

NKp46⁺-ILCs entwickeln sich im Knochenmark aus CLPs (Klose et al. 2014; Constantinides et al. 2014). Die Entwicklung und die Funktion der ILCs werden über Zytokine wie IL-7 und IL-15 gesteuert (Klose und Diefenbach). Nach Bindung beider Zytokine an ihre spezifischen Rezeptoren erfolgt die Phosphorylierung von STAT5 (Signalmolekül und Aktivator von Transkription) (Rochman et al. 2009). STAT5 ist essentiell für die Entwicklung und das Überleben von NKp46⁺-ILCs (Eckelhart et al. 2011; Klose et al. 2014). Es ist bereits bekannt, dass IL-15 durch die Regulation des intrinsischen Apoptosesignalweges das Überleben von NK-Zellen beeinflusst. In IL-15-defizienten Tieren liegt eine vermehrte Proteinproduktion von pro-apoptischen Modulatoren wie Bim und Noxa gegenüber anti-apoptischen Molekülen wie Mcl-1 vor (Huntington et al. 2007a).

Die Zielgene, über die Zytokinsignale zur Bildung und zum Überleben von ILCs wirken, sind größtenteils unbekannt. Das Protein c-Flip wird in verschiedenen Zellpopulationen als anti-apoptisches Molekül beschrieben (Chau et al. 2005; Huang et al. 2010; Plaza-Sirvent et al. 2017). Der Einfluss von c-Flip auf die Bildung und/oder das Überleben von NKp46⁺-ILCs war bislang unbekannt.

5.1 Mit NK^{Δc-FLIP}-Mäusen lässt sich die Bedeutung von c-Flip für die Bildung von NKp46⁺-ILCs und deren Relevanz *in vivo* testen

Um die Rolle von c-Flip für die Entwicklung und das Überleben von NKp46⁺-ILCs zu untersuchen, wurde die konditionale NK^{Δc-FLIP}-Maus generiert. Die NKp46^{Cre}-Knockout-Maus exprimiert die Rekombinase Cre unter Kontrolle des *NKp46*-Promotors und erlaubt so die Modifikation von Genen, die mit entsprechenden loxP-Sequenzen selektiv in NKp46-exprimierenden Zellen versehen wurden (Narni-Mancinelli et al. 2011). Die NKp46^{Cre}-Maus stellt eine der wenigen Möglichkeiten dar, NKp46⁺-ILCs bei intaktem T- und B-Zellkompartiment zu untersuchen. Der Einfluss von ILCs in Krankheitsmodellen wurden bisher oft in T- und B-Zell-defizienten Tieren durchgeführt und lässt deshalb nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächliche Bedeutung von ILCs in einer T- und B-Zell-kompetenten Umgebung zu (Sawa et al. 2011).

Ein konventioneller c-Flip-Knockout ist aufgrund starker Herzfehlbildungen embryonal letal (Yeh et al. 2000). In der konditionalen c-Flip Knockout-Maus erreichten Zhang *et al.* eine Reduktion der Proteinexpression von c-Flip von >98% in Thymozyten bei Kombination mit Lck-Cre-transgenen Mäusen (Zhang 2005). In der neu generierten NK^{Δc-FLIP}-Maus entfernt die Cre-Rekombinase den von loxP-Seiten flankierten Teil des *Cflar*-Gens, was zur Inaktivierung des *Cflar*-Gens in NKp46-exprimierenden Zellen führt. Auf diese Weise können

Folgen der *Cflar*-Inaktivierung in NKp46⁺-ILCs in T- und B-Zell-kompetenten Mäusen untersucht werden.

Unter physiologischen Bedingungen zeigen die NK^{Δc-FLIP}-Mäuse im Vergleich zu NK^{WT}-Mäusen ein unbeeinträchtigt äußeres Erscheinungsbild, vergleichbare Fertilität und Verteilung der Genotypen nach Mendel. Untersuchungen zur Zusammensetzung der Immunzellpopulationen in Blut, Milz, Leber und Knochenmark der NK^{Δc-FLIP}-Mäusen im Vergleich zu NK^{WT}-Mäusen ergaben, dass die Frequenzen und absoluten Zahlen von CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen unverändert waren (Abb. 4.3-4.5). Dies galt auch für die Anzahl und Frequenzen der B-Zellen, DCs, Makrophagen und Granulozyten in Blut, Milz, Leber und Knochenmark von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen (Abb. 4.6, Abb. 4.7). Die spezifische Deletion von c-Flip in NKp46-exprimierenden Zellen scheint also weder die Entwicklung noch die Homöostase der Zellen des adaptiven (T-Zellen, B-Zellen) oder des angeborenen Immunsystems (DCs, Makrophagen und Neutrophile) zu beeinflussen (Abbildung 4.3-4.7). Im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollen zeigte sich in NK^{Δc-FLIP} Mäusen ein signifikanter Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs (Abbildung Abb. 4.1, Abb. 4.2).

Es scheint, dass unter physiologischen Bedingungen der Verlust von NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs wenig Einfluss auf die Gesundheit und die Entwicklung der Tiere bis zum jungen Erwachsenenalter hat. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass T- und B-Zellen den Verlust von ILCs sowohl in Mäusen als auch in Menschen unter bestimmten Bedingungen kompensieren können (Song et al. 2015; Vély et al. 2016).

Weitgehend ungeklärt ist, wie NK^{Δc-FLIP}-Mäuse im Rahmen eines pathophysiologischen Modells im Vergleich zu NK^{WT}-Mäusen reagieren. Zum Beispiel verläuft eine intestinale Infektion mit *Citrobacter rodentium* in T- und B-Zell-defizienten Mäusen ohne NKp46⁺-ILC3 schwer, während in immunkompetenten Mäusen die Infektion auch ohne NKp46⁺-ILC3 eingedämmt wird (Rankin et al. 2016). Auch die Bedeutung von ILCs im Alter ist bisher unerforscht, da die meisten Untersuchungen mit Mäusen im jungen Erwachsenenalter durchgeführt werden. Die NK^{Δc-FLIP}-Maus kann in weiteren Studien dazu beitragen, die Rolle von NKp46⁺-ILCs im Immunsystem besser zu verstehen.

5.2 c-Flip schützt NKp46⁺-ILCs vor TNF-α-induzierter Apoptose

Als anti-apoptotisches Molekül schützt c-Flip unterschiedliche Immunzellen vor dem programmierten Zelltod. So führt eine Inaktivierung der *Cflar*-Gens in T-Zellen zur drastischen Verkleinerung des peripheren T-Zell-Pools (Zhang 2005). Die Analyse von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen zeigte, dass dies offensichtlich auch für NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs gilt (Abbildung Abb. 4.1, Abb. 4.2). Der drastische Verlust reifer NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs in Blut, Milz, Leber und Knochenmark stützt die Hypothese, dass c-Flip für das Überleben von ILCs während ihrer Entwicklung essentiell ist.

Ob c-Flip nur während der ILC-Entwicklung benötigt wird oder ob es auch für das Überleben peripherer ILCs von Bedeutung ist, ist noch unklar. Die Entwicklung reifer NK1.1⁺NKp46⁻-ILCs erfolgt in mehreren Schritten. Im ersten Schritt regulieren NK1.1⁺NKp46⁻ ILC-Vorläuferzellen NK1.1 hoch (Yu et al. 2013). Im nächsten Schritt wird NKp46 hochreguliert und es entstehen NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs (Yu et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ILC-Vorläuferzellen in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen zwar das NK1.1⁺NKp46⁻ Stadium erreichen, jedoch deutlich weniger NK1.1⁺NKp46⁺-Zellen gebildet werden (Abb. 4.8). Dies zeigte sich auch *in vitro*, wo durch die stark beeinträchtigte Entwicklung c-Flip-defizienter ILCs der Übergang vom NK1.1⁺NKp46⁻ zum NK1.1⁺NKp46⁺-Stadium deutlich reduziert war (Abb. 4.9).

Untersuchungen in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Ingo Schmitz haben gezeigt, dass die c-Flip_L-mRNA Mengen im Verlauf der ILC-Entwicklung kontinuierlich ansteigen (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass die Bedeutung von c-Flip im Laufe der ILC-Entwicklung zunimmt. Diese Interpretation steht im Einklang mit der Beobachtung, dass vor allem späte Schritte der Entwicklung c-Flip-defizienter ILC-Vorläuferzellen blockiert sind (Abb. 4.8 und 4.9).

c-Flip reguliert insbesondere den extrinsischen Apoptosesignalweg (Irmiler et al. 1997) und schützt vor Caspase-8-abhängiger Apoptose (Chau et al. 2005). Der extrinsische Weg der Apoptoseinduktion wird durch Todesrezeptorliganden wie TNF- α , FasL oder TRAIL induziert (Lavrik 2005), die auch von NKp46⁺-ILCs in großen Mengen produziert werden (Kashii et al. 1999; Klose et al. 2014; Ebbo et al. 2017). Mirandola *et al.* zeigten, dass aktivierte NK-Zellen sowohl TRAIL als auch den TRAIL-Rezeptor exprimieren und dass die Blockade der c-Flip-Expression zu einer verstärkten Sensitivität der Zellen gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose führt (Mirandola 2004). Die Differenzierung c-Flip-defizienter ILC-Vorläuferzellen zu NKp46⁺ ILCs ließ sich durch die Gabe des Casapse-Inhibitors QVD deutlich steigern (Abb. 4.10). Im Gegensatz dazu hatte die Blockade der Casapse-Aktivität in Wildtyp-Vorläuferzellen keine Wirkung, da ähnliche ILC-Anzahlen aus Casapse-Inhibitor behandelten und unbehandelten Kulturen generiert werden konnten. Unsere Daten legen demnach die Vermutung nahe, dass c-Flip die Casapse-vermittelte Apoptose in ILC-Vorläufern inhibiert und somit deren Differenzierung zu NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs ermöglicht (Abb. 4.10).

Verschiedene Todesrezeptorliganden können den extrinsischen Weg der Apoptoseinduktion auslösen (Lavrik 2005). Um den für die ILC-Entwicklung relevanten Signalweg zu identifizieren, wurde die Wirkung von FAS, TRAIL, oder TNF- α *in vitro* blockiert. Es zeigte sich, dass vor allem die Blockade von TNF- α die Differenzierung c-Flip-defizienter ILC-Vorläufer zu NKp46⁺-ILCs förderte (Abb. 4.11). Wenngleich die Ergebnisse nach TNF- α Blockade am deutlichsten waren, so förderte die Blockade von FasL und TRAIL ebenfalls die Entwicklung c-Flip-defizienter NKp46⁺-ILCs (Abb. 4.11). Dies legt nahe, dass c-Flip zur

Blockade mehrerer Signalwege beitragen kann, um den extrinsischen Apoptoseweg in ILC-Vorläufern zu blockieren und so deren Differenzierung zu NKp46⁺-ILCs zu gewährleisten.

Die Expression von TRAIL wird auf NK-Zellen nach Aktivierung durch IL-15 gesteigert (Kayagaki et al. 1999) und durch NKp46 reguliert (Sheppard et al. 2018). Sheppard *et al.* beobachteten, dass geringe Konzentrationen von IL-15 zu einer verstärkten Expression von NKp46 und TRAIL führen, die Expression jedoch mit steigender Konzentration von IL-15 wieder sinkt (Sheppard et al. 2018). Diese Versuche wurden mit reifen ILC1 durchgeführt. Aktuelle Daten der Arbeitsgruppe von Prof. Thomas Schüler zeigen, dass Todesrezeptoren auf NKp46⁺-ILCs in ihrer Entwicklung unterschiedlich stark exprimiert werden. Für die Rezeptoren von TRAIL, FAS und TNF wurden besonders im NK1.1⁺NKp46⁺-Stadium erhöhte mRNA-Mengen gemessen. Weitere Experimente der Arbeitsgruppe wiesen in der Entwicklung von NK1.1⁺NKp46⁻-ILCs zu NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs kontinuierlich steigende mRNA-Mengen für TNF- α und eine steigende Aktivität des *IFNG*-Promotors (Promotor für das IFN- γ -codierende Gen) nach. Es ist also zu vermuten, dass der Bedarf an c-Flip mit fortschreitender ILC-Differenzierung deshalb wächst, weil ILC-Vorläufer sowohl Todesliganden als auch deren Rezeptoren hochregulieren und damit das Risiko der Apoptoseinduktion steigt. Eine wichtige Frage für die Zukunft ist, ob c-Flip ILC-Vorläufer ausschließlich vor autokrinen Effekten der Todesliganden schützt, oder ob auch parakrine Effekte blockiert werden müssen, um eine normale ILC-Entwicklung *in vivo* zu gewährleisten. Desweiteren bleibt offen, ob c-Flip z.B. auch reife ILC1 schützt, die im Zuge von Immunantworten große Mengen an TNF- α produzieren (Klose et al. 2014; Dunay und Diefenbach 2018).

Damit NKp46⁺-ILCs trotz Anwesenheit von Apoptose-Signalen überleben und ausreifen können, sind sie unter physiologischen Bedingungen durch c-Flip geschützt. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass c-Flip die TNF- α -vermittelte Apoptose während der Reifung von NKp46⁺-ILCs inhibiert. Die Expression von c-Flip in NKp46⁺-ILCs ist daher essentiell für die Reifung und das Überleben dieser Zellen im Knochenmark. Zu welchem Zeitpunkt und unter welchen Umständen der ILC-Entwicklung c-Flip besonders wichtig ist, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Schüler.

Diese Arbeit klärt über bisher unbekannt Funktionen von c-Flip in NKp46⁺-ILC auf. Zudem ist die in dieser Arbeit vorgestellte NK ^{Δ c-FLIP}-Maus für weitere Untersuchungen von NKp46⁺-ILCs in Krankheitsmodellen in B- und T-Zell-kompetenten Tieren von herausragender Bedeutung.

6 Zusammenfassung

Innate lymphoid cells (ILCs) sind eine heterogene Gruppe von angeborenen Immunzellen der lymphoiden Zellreihe (Vivier et al. 2018). NKp46⁺-ILCs modulieren die Homöostase in verschiedenen Geweben (Spits und Di Santo, James P. 2011; Bernink et al. 2013; Ebbo et al. 2017) und die anti-mikrobielle Immunantwort (Vivier et al. 2008; Gladiator et al. 2013; Dunay und Diefenbach 2018). Über die intrazellulären Signalwege, die zur Entwicklung und zum Überleben von NKp46⁺-ILCs beitragen, ist bisher wenig bekannt. In der vorliegenden Dissertation wurde die Rolle des anti-apoptotischen Proteins c-Flip (Irmeler et al. 1997; Hu et al. 1997a) in NKp46⁺-ILCs untersucht. c-Flip wird vom *Cflar*-Gen kodiert. Um die c-Flip Produktion selektiv in NKp46⁺-ILCs zu inaktivieren, wurden NKp46-Cre-transgene Mäuse (NKp46-Cre⁺) (Narni-Mancinelli et al. 2011) mit c-Flip^{f^{fl}}-Mäusen (Zhang 2005) verpaart. Das *Cflar*-Gen der c-Flip^{f^{fl}}-Mäuse ist loxP-Sequenz-modifiziert, sodass es mittels Cre-vermittelter Rekombination inaktiviert werden kann. Die aus dieser Verpaarung hervorgehenden NKp46-Cre⁺ x c-Flip^{f^{fl}}-Mäuse wurden als NK^{Δc-FLIP}-Mäuse bezeichnet. Mäuse mit mindestens einem intakten *Cflar*-Gen dienten als NK^{WT}-Kontrollen.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Inaktivierung von c-Flip in NKp46⁺-Zellen einen Einfluss auf die Entwicklung des Immunsystems hat. Dazu wurden die Immunzellen von NK^{Δc-FLIP}-Mäusen und NK^{WT}-Mäusen in den Organen Milz, Blut, Leber und Knochenmark durchflusszytometrisch untersucht. Hier zeigte sich eine starke Reduktion der NKp46⁺-Zellen in NK^{Δc-FLIP}-Mäusen, ohne dass dies einen messbaren Effekt auf die Entwicklung von T- und B-Zellen bzw. myeloide Zellen hatte. Bei der NK^{Δc-FLIP}-Maus handelt es sich demnach um ein neues Modell, mit dessen Hilfe sich die Bedeutung von NKp46⁺-ILCs in Mäusen mit intaktem Immunsystem testen lässt.

Um den molekularen Mechanismus zu klären, wie c-Flip die Entwicklung von NKp46⁺-ILCs reguliert, wurde ein experimentelles System etabliert, mit dessen Hilfe sich Teile der ILC-Entwicklung *in vitro* nachvollziehen lassen. Dieses experimentelle System ermöglichte innerhalb von 9 Tagen die Entwicklung NKp46⁻-ILC Vorläufern aus NK^{WT}-Mäusen zu NK1.1⁺NKp46⁺-ILCs. Für ILC-Vorläufer aus NK^{Δc-FLIP}-Mäusen war diese Entwicklung stark eingeschränkt, konnte aber durch die Gabe eines Caspase-Inhibitors teilweise wiederhergestellt werden. Dies lässt den Rückschluss zu, dass c-Flip hauptsächlich Caspase-vermittelte Apoptose in ILC-Vorläufern inhibiert und dadurch die Differenzierung zu reifen NKp46⁺-ILC ermöglicht. Der Caspase 8-abhängige, extrinsische Weg der Apoptoseinduktion wird durch Signale von sogenannten „Todesrezeptoren“ ausgelöst (Murphy et al. 2012). Zur Analyse der Funktion von c-Flip bei Todesrezeptor-vermittelter Apoptose in NKp46⁺-ILC wurden Experimente mit blockierenden Antikörpern gegen verschiedene Todesrezeptoren im Zellkulturmodell durchgeführt. Hier zeigte sich, dass c-Flip die TNF-α-vermittelte Apoptose in einem frühen Stadium der Reifung von NKp46⁺-ILC

inhibiert. Die Expression von c-Flip in NKp46⁺-ILC ist daher essentiell für die Reifung dieser Zellen im Knochenmark.

Diese Arbeit klärt über bisher unbekannt Funktionen von c-Flip in NKp46⁺-ILC auf und liefert mit der Generierung und Charakterisierung der NK^{Δc-FLIP}-Maus ein geeignetes Modellsystem für weitere Untersuchungen von NKp46⁺-ILC in Tieren mit intaktem Immunsystem unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

7 Literaturverzeichnis

1. Abt, Michael C.; Lewis, Brittany B.; Caballero, Silvia; Xiong, Huizhong; Carter, Rebecca A.; Sušac, Bože et al. (2015): Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. In: *Cell host & microbe* 18 (1), S. 27–37. DOI: 10.1016/j.chom.2015.06.011.
2. Aggarwal, Bharat B. (2003): Signalling pathways of the TNF superfamily. A double-edged sword. In: *Nat Rev Immunol* 3 (9), S. 745–756. DOI: 10.1038/nri1184. Artis, David; Spits, Hergen (2015): The biology of innate lymphoid cells. In: *Nature* 517 (7534), S. 293–301. DOI: 10.1038/nature14189.
3. Ashkenazi, Avi; Dixit, Vishva M. (1999): Apoptosis control by death and decoy receptors. In: *Current Opinion in Cell Biology* 11 (2), S. 255–260. DOI: 10.1016/S0955-0674(99)80034-9.
4. Baaten, Bas J. G.; Cooper, Andrea M.; Swain, Susan L.; Bradley, Linda M. (2013): Location, location, location: the impact of migratory heterogeneity on T cell function. In: *Frontiers in immunology* 4, S. 311. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00311.
5. Bernink, Jochem H.; Peters, Charlotte P.; Munneke, Marius; te Velde, Anje A.; Meijer, Sybren L.; Weijer, Kees et al. (2013): Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. In: *Nature immunology* 14 (3), S. 221–229. DOI: 10.1038/ni.2534.
6. Budagian, Vadim; Bulanova, Elena; Paus, Ralf; Bulfone-Paus, Silvia (2006): IL-15/IL-15 receptor biology: a guided tour through an expanding universe. In: *Cytokine & growth factor reviews* 17 (4), S. 259–280. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2006.05.001.
7. Chau, Hien; Wong, Veronica; Chen, Nien-Jung; Huang, Huey-Lan; Lin, Wen-Jye; Mirtsos, Christine et al. (2005): Cellular FLICE-inhibitory protein is required for T cell survival and cycling. In: *The Journal of experimental medicine* 202 (3), S. 405–413. DOI: 10.1084/jem.20050118.
8. Chiossone, L.; Chaix, J.; Fuseri, N.; Roth, C.; Vivier, E.; Walzer, T. (2009): Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. In: *Blood* 113 (22), S. 5488–5496. DOI: 10.1182/blood-2008-10-187179.
9. Colucci, Francesco; Caligiuri, Michael A.; Di Santo, James P. (2003): What does it take to make a natural killer? In: *Nature reviews. Immunology* 3 (5), S. 413–425. DOI: 10.1038/nri1088.
10. Comi, C.; Fleetwood, T.; Dianzani, U. (2012): The role of T cell apoptosis in nervous system autoimmunity. In: *Autoimmunity reviews* 12 (2), S. 150–156. DOI: 10.1016/j.autrev.2011.08.011.
11. Constantinides, Michael G.; McDonald, Benjamin D.; Verhoef, Philip A.; Bendelac, Albert (2014): A committed precursor to innate lymphoid cells. In: *Nature* 508 (7496), S. 397–401. DOI: 10.1038/nature13047.
12. Danial, Nika N.; Korsmeyer, Stanley J. (2004): Cell Death. In: *Cell* 116 (2), S. 205–219. DOI: 10.1016/S0092-8674(04)00046-7.
13. Daussy, Cécile; Faure, Fabrice; Mayol, Katia; Viel, Sébastien; Gasteiger, Georg; Charrier, Emily et al. (2014): T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. In: *The Journal of experimental medicine* 211 (3), S. 563–577. DOI: 10.1084/jem.20131560.
14. Dunay, I. R.; Diefenbach, A. (2018): Group 1 innate lymphoid cells in *Toxoplasma gondii* infection. In: *Parasite immunology* 40 (2). DOI: 10.1111/pim.12516.

15. Ebbo, Mikaël; Crinier, Adeline; Vély, Frédéric; Vivier, Eric (2017): Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. In: *Nature reviews. Immunology* 17 (11), S. 665–678. DOI: 10.1038/nri.2017.86.
16. Eckelhart, E.; Warsch, W.; Zebedin, E.; Simma, O.; Stoiber, D.; Kolbe, T. et al. (2011): A novel Ncr1-Cre mouse reveals the essential role of STAT5 for NK-cell survival and development. In: *Blood* 117 (5), S. 1565–1573. DOI: 10.1182/blood-2010-06-291633.
17. Fuchs, Anja; Vermi, William; Lee, Jacob S.; Lonardi, Silvia; Gilfillan, Susan; Newberry, Rodney D. et al. (2013): Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN- γ -producing cells. In: *Immunity* 38 (4), S. 769–781. DOI: 10.1016/j.immuni.2013.02.010.
18. Gasteiger, Georg; Fan, Xiyang; Dikiy, Stanislav; Lee, Sue Y.; Rudensky, Alexander Y. (2015): Tissue residency of innate lymphoid cells in lymphoid and nonlymphoid organs. In: *Science (New York, N.Y.)* 350 (6263), S. 981–985. DOI: 10.1126/science.aac9593.
19. Gladiator, André; Wangler, Nicolette; Trautwein-Weidner, Kerstin; LeibundGut-Landmann, Salomé (2013): Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190 (2), S. 521–525. DOI: 10.4049/jimmunol.1202924.
20. Golks, A.; Brenner, D.; Fritsch, C.; Krammer, P. H.; Lavrik, I. N. (2005): c-FLIPR, a New Regulator of Death Receptor-induced Apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (15), S. 14507–14513. DOI: 10.1074/jbc.M414425200.
21. Gordon, Scott M.; Chaix, Julie; Rupp, Levi J.; Wu, Junmin; Madera, Sharline; Sun, Joseph C. et al. (2012): The Transcription Factors T-bet and Eomes Control Key Checkpoints of Natural Killer Cell Maturation. In: *Immunity* 36 (1), S. 55–67. DOI: 10.1016/j.immuni.2011.11.016.
22. Grégoire, Claude; Chasson, Lionel; Luci, Carmelo; Tomasello, Elena; Geissmann, Frédéric; Vivier, Eric; Walzer, Thierry (2007): The trafficking of natural killer cells. In: *Immunological reviews* 220, S. 169–182. DOI: 10.1111/j.1600-065X.2007.00563.x.
23. Halfteck, Gili G.; Elboim, Moran; Gur, Chamutal; Achdout, Hagit; Ghadially, Hormas; Mandelboim, Ofer (2009): Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 182 (4), S. 2221–2230. DOI:10.4049/jimmunol.0801878.
24. Hennino, A.; Berard, M.; Casamayor-Pallejà, M.; Krammer, P. H.; Defrance, T. (2000): Regulation of the Fas death pathway by FLICE-inhibitory protein in primary human B cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 165 (6), S. 3023–3030.
25. Hu, S.; Vincenz, C.; Buller, M.; Dixit, V. M. (1997a): A Novel Family of Viral Death Effector Domain-containing Molecules That Inhibit Both CD-95- and Tumor Necrosis Factor Receptor-1-induced Apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (15), S. 9621–9624. DOI: 10.1074/jbc.272.15.9621.
26. Hu, S.; Vincenz, C.; Ni, J.; Gentz, R.; Dixit, V. M. (1997b): I-FLICE, a Novel Inhibitor of Tumor Necrosis Factor Receptor-1- and CD-95-induced Apoptosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 272 (28), S. 17255–17257. DOI: 10.1074/jbc.272.28.17255.
27. Huang, Qi-Quan; Perlman, Harris; Huang, Zan; Birkett, Robert; Kan, Lixin; Agrawal, Hemant et al. (2010): FLIP: a novel regulator of macrophage differentiation and granulocyte homeostasis. In: *Blood* 116 (23), S. 4968–4977. DOI: 10.1182/blood-2009-11-252841.

28. Huntington, Nicholas D.; Puthalakath, Hamsa; Gunn, Priscilla; Naik, Edwina; Michalak, Ewa M.; Smyth, Mark J. et al. (2007a): Interleukin 15-mediated survival of natural killer cells is determined by interactions among Bim, Noxa and Mcl-1. In: *Nature immunology* 8 (8), S. 856–863. DOI: 10.1038/ni1487.
29. Huntington, Nicholas D.; Vosshenrich, Christian A. J.; Di Santo, James P. (2007b): Developmental pathways that generate natural-killer-cell diversity in mice and humans. In: *Nat Rev Immunol* 7 (9), S. 703–714. DOI: 10.1038/nri2154.
30. Imai, Kazue; Matsuyama, Satoru; Miyake, Satoshi; Suga, Kenji; Nakachi, Kei (2000): Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence. An 11-year follow-up study of a general population. In: *The Lancet* 356 (9244), S. 1795–1799. DOI: 10.1016/S0140-6736(00)03231-1.
31. Irmeler, M.; Thome, M.; Hahne, M.; Schneider, P.; Hofmann, K.; Steiner, V. et al. (1997): Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. In: *Nature* 388 (6638), S. 190–195. DOI: 10.1038/40657.
32. Kashii, Y.; Giorda, R.; Herberman, R. B.; Whiteside, T. L.; Vujanovic, N. L. (1999): Constitutive expression and role of the TNF family ligands in apoptotic killing of tumor cells by human NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (10), S. 5358–5366.
33. Kayagaki, N.; Yamaguchi, N.; Nakayama, M.; Takeda, K.; Akiba, H.; Tsutsui, H. et al. (1999): Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 163 (4), S. 1906–1913.
34. Kennedy, Mary K.; Glaccum, Moira; Brown, Sandra N.; Butz, Eric A.; Viney, Joanne L.; Embers, Monica et al. (2000): Reversible Defects in Natural Killer and Memory Cd8 T Cell Lineages in Interleukin 15–Deficient Mice. In: *J Exp Med* 191 (5), S. 771–780. DOI: 10.1084/jem.191.5.771.
35. Kiessling, R.; Klein, E.; Pross, H.; Wigzell, H. (1975): "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. In: *European journal of immunology* 5 (2), S. 117–121. DOI: 10.1002/eji.1830050209.
36. Kim, Sungjin; Iizuka, Koho; Kang, Hyun-Seok P.; Dokun, Ayotunde; French, Anthony R.; Greco, Suellen; Yokoyama, Wayne M. (2002): In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. In: *Nat. Immunol.* 3 (6), S. 523–528. DOI: 10.1038/ni796.
37. Kim, Sungjin; Poursine-Laurent, Jennifer; Truscott, Steven M.; Lybarger, Lonnie; Song, Yun-Jeong; Yang, Liping et al. (2005): Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. In: *Nature* 436 (7051), S. 709–713. DOI: 10.1038/nature03847.
38. Klose, Christoph S. N.; Diefenbach, Andreas: Transcription Factors Controlling Innate Lymphoid Cell Fate Decisions, zuletzt geprüft am 25.07.2014. Klose, Christoph S.N.; Flach, Melanie; Möhle, Luisa; Rogell, Leif; Hoyler, Thomas; Ebert, Karolina et al. (2014): Differentiation of Type 1 ILCs from a Common Progenitor to All Helper-like Innate Lymphoid Cell Lineages. In: *Cell* 157 (2), S. 340–356. DOI:10.1016/j.cell.2014.03.030.
39. Koka, Rima; Burkett, Patrick R.; Chien, Marcia; Chai, Sophia; Chan, Faye; Lodolce, James P. et al. (2003): Interleukin (IL)-15 α -deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15 α -deficient mice. In: *The Journal of experimental medicine* 197 (8), S. 977–984. DOI: 10.1084/jem.20021836.

40. Krueger, A.; Baumann, S.; Krammer, P. H.; Kirchhoff, S. (2001): FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (24), S. 8247–8254. DOI: 10.1128/MCB.21.24.8247-8254.2001.
41. Lanier, Lewis L. (2008): Up on the tightrope. Natural killer cell activation and inhibition. In: *Nat Immunol* 9 (5), S. 495–502. DOI: 10.1038/ni1581.
42. Lavrik, I. (2005): Death receptor signaling. In: *Journal of Cell Science* 118 (2), S. 265–267. DOI: 10.1242/jcs.01610.
43. Lavrik, I. N.; Krammer, P. H. (2011): Regulation of CD95/Fas signaling at the DISC. In: *Cell Death Differ* 19 (1), S. 36–41. DOI: 10.1038/cdd.2011.155.
44. Levin, Alon D.; Wildenberg, Manon E.; van den Brink, Gijs R. (2016): Mechanism of Action of Anti-TNF Therapy in Inflammatory Bowel Disease. In: *Journal of Crohn's & colitis* 10 (8), S. 989–997. DOI: 10.1093/ecco-jcc/jjw053.
45. Ljunggren, Hans-Gustaf; Malmberg, Karl-Johan (2007): Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. In: *Nat Rev Immunol* 7 (5), S. 329–339. DOI: 10.1038/nri2073.
46. Locksley, Richard M.; Killeen, Nigel; Lenardo, Michael J. (2001): The TNF and TNF Receptor Superfamilies. In: *Cell* 104 (4), S. 487–501. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00237-9.
47. Lodolce, James P.; Boone, David L.; Chai, Sophia; Swain, Rachel E.; Dassopoulos, Themistocles; Trettin, Shanthi; Ma, Averil (1998): IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation. In: *Immunity* 9 (5), S. 669–676. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80664-0.
48. Luther, C.; Warner, K.; Takei, F. (2011): Unique progenitors in mouse lymph node develop into CD127+ NK cells: thymus-dependent and thymus-independent pathways. In: *Blood* 117 (15), S. 4012–4021. DOI: 10.1182/blood-2010-07-298901.
49. Mandelboim, O.; Lieberman, N.; Lev, M.; Paul, L.; Arnon, T. I.; Bushkin, Y. et al. (2001): Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. In: *Nature* 409 (6823), S. 1055–1060. DOI: 10.1038/35059110.
50. Meazza, Raffaella; Azzarone, Bruno; Orengo, Anna Maria; Ferrini, Silvano (2011): Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy. In: *Journal of biomedicine & biotechnology* 2011, S. 861920. DOI: 10.1155/2011/861920.
51. Micheau, O.; Lens, S.; Gaide, O.; Alevizopoulos, K.; Tschopp, J. (2001): NF- κ B Signals Induce the Expression of c-FLIP. In: *Molecular and Cellular Biology* 21 (16), S. 5299–5305. DOI: 10.1128/MCB.21.16.5299–5305.2001.
52. Micheau, Olivier; Tschopp, Jürg (2003): Induction of TNF Receptor I-Mediated Apoptosis via Two Sequential Signaling Complexes. In: *Cell* 114 (2), S. 181–190. DOI: 10.1016/S0092-8674(03)00521-X.
53. Mirandola, P. (2004): Activated human NK and CD8+ T cells express both TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and TRAIL receptors but are resistant to TRAIL-mediated cytotoxicity. In: *Blood* 104 (8), S. 2418–2424. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1294.
54. Morvan, Maelig G.; Lanier, Lewis L. (2016): NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. In: *Nature reviews. Cancer* 16 (1), S. 7–19. DOI: 10.1038/nrc.2015.5.
55. Murphy, Kenneth P.; Janeway, Charles A.; Travers, Paul; Walport, Mark; Mowat, Allan; Weaver, Casey T. (2012): *Janeway's immunobiology*. 8. ed. London: Garland Science.

56. Naito, M.; Katayama, R.; Ishioka, T.; Suga, A.; Takubo, K.; Nanjo, M. et al. (2004): Cellular FLIP Inhibits β -Catenin Ubiquitylation and Enhances Wnt Signaling. In: *Molecular and Cellular Biology* 24 (19), S. 8418–8427. DOI: 10.1128/MCB.24.19.8418-8427.2004.
57. Nakano, T.; Kodama, H.; Honjo, T. (1994): Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture. In: *Science* 265 (5175), S. 1098–1101. DOI: 10.1126/science.8066449.
58. Narni-Mancinelli, E.; Chaix, J.; Fenis, A.; Kerdiles, Y. M.; Yessaad, N.; Reynders, A. et al. (2011): Fate mapping analysis of lymphoid cells expressing the NKp46 cell surface receptor (45).
59. Narni-Mancinelli, Emilie; Gauthier, Laurent; Baratin, Myriam; Guia, Sophie; Fenis, Aurore; Deghmane, Ala-Eddine et al. (2017): Complement factor P is a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp46. In: *Science immunology* 2 (10). DOI: 10.1126/sciimmunol.aam9628.
60. Nicholson, D. W. (1999): Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. In: *Cell Death Differ* 6 (11), S. 1028–1042. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400598.
61. Nussbaum, Jesse C.; van Dyken, Steven J.; Moltke, Jakob von; Cheng, Laurence E.; Mohapatra, Alexander; Molofsky, Ari B. et al. (2013): Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. In: *Nature* 502 (7470), S. 245–248. DOI: 10.1038/nature12526.
62. Orange, Jordan S. (2013): Natural killer cell deficiency. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132 (3), S. 515–525. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.07.020.
63. Paunovic, Verica; Carter, Natalie A.; Thalhamer, Theresa; Blair, Derek; Gordon, Brian; Lacey, Erica et al. (2012): Immune complex-mediated co-ligation of the BCR with Fc γ RIIB results in homeostatic apoptosis of B cells involving Fas signalling that is defective in the MRL/Lpr model of systemic lupus erythematosus. In: *Journal of autoimmunity* 39 (4), S. 332–346. DOI: 10.1016/j.jaut.2012.04.006.
64. Pearce, Erika L.; Mullen, Alan C.; Martins, Gislaine A.; Krawczyk, Connie M.; Hutchins, Anne S.; Zediak, Valerie P. et al. (2003): Control of effector CD8⁺ T cell function by the transcription factor Eomesodermin. In: *Science (New York, N.Y.)* 302 (5647), S. 1041–1043. DOI: 10.1126/science.1090148.
65. Perlman, H.; Pagliari, L. J.; Georganas, C.; Mano, T.; Walsh, K.; Pope, R. M. (1999): FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to fas-mediated apoptosis. In: *The Journal of experimental medicine* 190 (11), S. 1679–1688.
66. Plaza-Sirvent, Carlos; Schuster, Marc; Neumann, Yvonne; Heise, Ulrike; Pils, Marina C.; Schulze-Osthoff, Klaus; Schmitz, Ingo (2017): c-FLIP Expression in Foxp3-Expressing Cells Is Essential for Survival of Regulatory T Cells and Prevention of Autoimmunity. In: *Cell Reports* 18 (1), S. 12–22. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.022.
67. Popivanova, Boryana K.; Kitamura, Kazuya; Wu, Yu; Kondo, Toshikazu; Kagaya, Takashi; Kaneko, Shiuchi et al. (2008): Blocking TNF-alpha in mice reduces colorectal carcinogenesis associated with chronic colitis. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (2), S. 560–570. DOI: 10.1172/JCI32453.
68. Possot, Cécilie; Schmutz, Sandrine; Chea, Sylvestre; Boucontet, Laurent; Louise, Anne; Cumano, Ana; Golub, Rachel (2011): Notch signaling is necessary for adult, but not fetal, development of ROR γ t(+) innate lymphoid cells. In: *Nature immunology* 12 (10), S. 949–958. DOI: 10.1038/ni.2105.

69. Rankin, Lucille C.; Girard-Madoux, Mathilde J. H.; Seillet, Cyril; Mielke, Lisa A.; Kerdiles, Yann; Fenis, Aurore et al. (2016): Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. In: *Nature immunology* 17 (2), S. 179–186. DOI: 10.1038/ni.3332.
70. Rankin, Lucille C.; Groom, Joanna R.; Chopin, Michaël; Herold, Marco J.; Walker, Jennifer A.; Mielke, Lisa A. et al. (2013): The transcription factor T-bet is essential for the development of NKp46+ innate lymphocytes via the Notch pathway. In: *Nat Immunol* 14 (4), S. 389–395. DOI: 10.1038/ni.2545.
71. Rescigno, M.; Piguet, V.; Valzasina, B.; Lens, S.; Zubler, R.; French, L. et al. (2000): Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. In: *The Journal of experimental medicine* 192 (11), S. 1661–1668.
72. Rochman, Yrina; Spolski, Rosanne; Leonard, Warren J. (2009): New insights into the regulation of T cells by gamma(c) family cytokines. In: *Nature reviews. Immunology* 9 (7), S. 480–490. DOI: 10.1038/nri2580.
73. Rosmaraki, Eleftheria E.; Douagi, Iyadh; Roth, Claude; Colucci, Francesco; Cumano, Ana; Di Santo, James P. (2001): Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. In: *Eur. J. Immunol.* 31 (6), S. 1900–1909. DOI: 10.1002/1521-4141(200106)31:6<1900::AID-IMMU1900>3.0.CO;2-M.
74. Sallusto, F.; Lenig, D.; Förster, R.; Lipp, M.; Lanzavecchia, A. (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. In: *Nature* 401 (6754), S. 708–712. DOI: 10.1038/44385.
75. Sawa, Shinichiro; Lochner, Matthias; Satoh-Takayama, Naoko; Dulauroy, Sophie; Bérard, Marion; Kleinschek, Melanie et al. (2011): RORγt+ innate lymphoid cells regulate intestinal homeostasis by integrating negative signals from the symbiotic microbiota. In: *Nat Immunol* 12 (4), S. 320–326. DOI: 10.1038/ni.2002.
76. Schmidt-Supprian, Marc; Rajewsky, Klaus (2007): Vagaries of conditional gene targeting. In: *Nat Immunol* 8 (7), S. 665–668. DOI: 10.1038/ni0707-665.
77. Sheppard, Sam; Schuster, Iona S.; Andoniou, Christopher E.; Cocita, Clement; Adejumo, Thomas; Kung, Sam K. P. et al. (2018): The Murine Natural Cytotoxic Receptor NKp46/NCR1 Controls TRAIL Protein Expression in NK Cells and ILC1s. In: *Cell Reports* 22 (13), S. 3385–3392. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.03.023.
78. Shu, Hong-Bing; Halpin, David R.; Goeddel, David V. (1997): Casper Is a FADD- and Caspase-Related Inducer of Apoptosis. In: *Immunity* 6 (6), S. 751–763. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80450-1.
79. Siegel, Richard M. (2006): Caspases at the crossroads of immune-cell life and death. In: *Nat Rev Immunol* 6 (4), S. 308–317. DOI: 10.1038/nri1809.
80. Silke, John (2011): The regulation of TNF signalling. What a tangled web we weave. In: *Current Opinion in Immunology* 23 (5), S. 620–626. DOI: 10.1016/j.coi.2011.08.002.
81. Smith, Craig A.; Farrah, Terry; Goodwin, Raymond G. (1994): The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins. Activation, costimulation, and death. In: *Cell* 76 (6), S. 959–962. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90372-7.
82. Song, Christina; Lee, Jacob S.; Gilfillan, Susan; Robinette, Michelle L.; Newberry, Rodney D.; Stappenbeck, Thaddeus S. et al. (2015): Unique and redundant functions of NKp46+ ILC3s in models of intestinal inflammation. In: *The Journal of experimental medicine* 212 (11), S. 1869–1882. DOI: 10.1084/jem.20151403.

83. Sonnenberg, Gregory F.; Artis, David (2012): Innate Lymphoid Cell Interactions with Microbiota: Implications for Intestinal Health and Disease. In: *Immunity* 37 (4), S. 601–610. DOI: 10.1016/j.immuni.2012.10.003.
84. Spits, Hergen; Artis, David; Colonna, Marco; Diefenbach, Andreas; Di Santo, James P.; Eberl, Gerard et al. (2013): Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. In: *Nat Rev Immunol* 13 (2), S. 145–149. DOI: 10.1038/nri3365.
85. Spits, Hergen; Bernink, Jochem H.; Lanier, Lewis (2016): NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense. In: *Nature immunology* 17 (7), S. 758–764. DOI: 10.1038/ni.3482.
86. Spits, Hergen; Cupedo, Tom (2012): Innate lymphoid cells: emerging insights in development, lineage relationships, and function. In: *Annual review of immunology* 30, S. 647–675. DOI: 10.1146/annurev-immunol-020711-075053.
87. Spits, Hergen; Di Santo, James P. (2011): The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. In: *Nature immunology* 12 (1), S. 21–27. DOI: 10.1038/ni.1962.
88. Sun, Joseph C.; Lanier, Lewis L. (2011): NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. In: *Nat Rev Immunol* 11 (10), S. 645–657. DOI: 10.1038/nri3044.
89. Thome, M.; Tschopp, J. (2001): Regulation of lymphocyte proliferation and death by FLIP. In: *Nature reviews. Immunology* 1 (1), S. 50–58. DOI: 10.1038/35095508.
90. Thome, Margot; Schneider, Pascal; Hofmann, Kay; Fickenscher, Helmut; Meinel, Edgar; Neipel, Frank et al. (1997): Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. In: *Nature* 386 (6624), S. 517–521. DOI: 10.1038/386517a0.
91. Ueffing, N.; Keil, E.; Freund, C.; Kühne, R.; Schulze-Osthoff, K.; Schmitz, I. (2008): Mutational analyses of c-FLIPR, the only murine short FLIP isoform, reveal requirements for DISC recruitment. In: *Cell death and differentiation* 15 (4), S. 773–782. DOI: 10.1038/sj.cdd.4402314;
92. Vély, Frédéric; Barlogis, Vincent; Vallentin, Blandine; Neven, Bénédicte; Piperoglou, Christelle; Ebbo, Mikael et al. (2016): Evidence of innate lymphoid cell redundancy in humans. In: *Nature immunology* 17 (11), S. 1291–1299. DOI: 10.1038/ni.3553.
93. Vivier, Eric; Artis, David; Colonna, Marco; Diefenbach, Andreas; Di Santo, James P.; Eberl, Gérard et al. (2018): Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. In: *Cell* 174 (5), S. 1054–1066. DOI: 10.1016/j.cell.2018.07.017.
94. Vivier, Eric; Tomasello, Elena; Baratin, Myriam; Walzer, Thierry; Ugolini, Sophie (2008): Functions of natural killer cells. In: *Nat Immunol* 9 (5), S. 503–510. DOI: 10.1038/ni1582.
95. Vonarbourg, Cedric; Mortha, Arthur; Bui, Viet L.; Hernandez, Pedro P.; Kiss, Elina A.; Hoyler, Thomas et al. (2010): Regulated Expression of Nuclear Receptor ROR γ t Confers Distinct Functional Fates to NK Cell Receptor-Expressing ROR γ t+ Innate Lymphocytes. In: *Immunity* 33 (5), S. 736–751. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.10.017.
96. Vono, Maria; Lin, Ang; Norrby-Teglund, Anna; Koup, Richard A.; Liang, Frank; Loré, Karin (2017): Neutrophils acquire the capacity for antigen presentation to memory CD4+ T cells in vitro and ex vivo. In: *Blood* 129 (14), S. 1991–2001. DOI: 10.1182/blood-2016-10-744441.
97. Vosshenrich, C. A. J.; Ranson, T.; Samson, S. I.; Corcuff, E.; Colucci, F.; Rosmaraki, E. E.; Di Santo, J. P. (2005): Roles for Common Cytokine Receptor γ -Chain-Dependent Cytokines in the Generation, Differentiation, and Maturation of NK Cell

- Precursors and Peripheral NK Cells in Vivo. In: *The Journal of Immunology* 174 (3), S. 1213–1221. DOI: 10.4049/jimmunol.174.3.1213.
98. Wallin, Robert P. A.; Screpanti, Valentina; Michaëlsson, Jakob; Grandien, Alf; Ljunggren, Hans-Gustaf (2003): Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. In: *European journal of immunology* 33 (10), S. 2727–2735. DOI: 10.1002/eji.200324070.
99. Wang, J.; Lobito, A. A.; Shen, F.; Hornung, F.; Winoto, A.; Lenardo, M. J. (2000): Inhibition of Fas-mediated apoptosis by the B cell antigen receptor through c-FLIP. In: *European journal of immunology* 30 (1), S. 155–163. DOI: 10.1002/1521-4141(200001)30:1<155::AID-IMMU155>3.0.CO;2-X.
100. Wang, Lai; Du, Fenghe; Wang, Xiaodong (2008): TNF- α Induces Two Distinct Caspase-8 Activation Pathways. In: *Cell* 133 (4), S. 693–703. DOI: 10.1016/j.cell.2008.03.036.
101. Wertz, I. E.; Dixit, V. M. (2009): Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. In: *Cell Death Differ* 17 (1), S. 14–24. DOI: 10.1038/cdd.2009.168.
102. Yeh, Wen-Chen; Itie, Annick; Elia, Andrew J.; Ng, Michelle; Shu, Hong-Bing; Wakeham, Andrew et al. (2000): Requirement for Casper (c-FLIP) in Regulation of Death Receptor-Induced Apoptosis and Embryonic Development. In: *Immunity* 12 (6), S. 633–642. DOI: 10.1016/S1074-7613(00)80214-9.
103. Youle, Richard J.; Strasser, Andreas (2008): The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 9 (1), S. 47–59. DOI: 10.1038/nrm2308.
104. Yu, Jianhua; Freud, Aharon G.; Caligiuri, Michael A. (2013): Location and cellular stages of natural killer cell development. In: *Trends in Immunology* 34 (12), S. 573–582. DOI: 10.1016/j.it.2013.07.005.
105. Zenewicz, Lauren A.; Yancopoulos, George D.; Valenzuela, David M.; Murphy, Andrew J.; Stevens, Sean; Flavell, Richard A. (2008): Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease. In: *Immunity* 29 (6), S. 947–957. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.11.003.
106. Zhang, N. (2005): An essential role for c-FLIP in the efficient development of mature T lymphocytes. In: *Journal of Experimental Medicine* 202 (3), S. 395–404. DOI: 10.1084/jem.20050117.
107. Zook, Erin C.; Kee, Barbara L. (2016): Development of innate lymphoid cells. In: *Nature immunology* 17 (7), S. 775–782. DOI: 10.1038/ni.3481.

8 Danksagung

Die Danksagung ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

9 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Wirkung von c-Flip auf „Innate Lymphoid Cells“

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie mit Unterstützung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Schüler ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Mülheim, den 14.03.2020

10 Darstellung des Bildungsweges

Die Darstellung des Bildungsweges ist in der Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.