

Aus dem Department für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Pharmakogenomik der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie und Toxikologie

**Der Einfluss des Adaptorproteins SLy1 auf den Phänotyp
und die Funktion pulmonaler NK-Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Eiperle, Victoria Eve

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Beer-Hammer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Tag der Disputation: 16.02.2023

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iv
Tabellenverzeichnis	vi
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.2 Natürliche Killerzellen	2
1.2.1 Funktion von NK-Zellen	2
1.2.2 Oberflächenrezeptoren von NK-Zellen	3
1.2.3 Selbsttoleranz von NK-Zellen	5
1.2.4 NK-Zellen in der Lunge	6
1.2.5 NK-Zell-Dysfunktion	7
1.3 Das Adaptorprotein SLy1	9
1.3.1 SLy1 in NK-Zellen	10
1.4 <i>DNA damage response</i>	12
1.4.1 Einzelstrangbrüche und die ATR/Chk1 Kaskade	12
1.4.2 Doppelstrangbrüche und die ATM/Chk2 Kaskade	13
1.4.3 p53 und Mdm2	14
1.5 Zielsetzung der Arbeit	15
2 Materialien	16
3 Methoden	22
3.1 Versuchstiere	22
3.1.1 SLy1 ^{WT/KO} Mäuse	22
3.1.2 SLy1 ^{WT/KO} p53 ^{WT/KO} Mäuse	22
3.1.3 Aufbereitung der Organe	23
3.2 Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1 Genotypisierung der Mäuse	24

3.3	Zellbiologische Methoden	25
3.3.1	Bestimmung der Zellzahl	25
3.3.2	Zellkultur	25
3.3.3	Erythrozytenlyse	26
3.3.4	<i>Magnetic activated cell sorting</i> (MACS)	26
3.3.5	Durchflusszytometrie	27
3.3.6	Durchflusszytometrische Analyse von pulmonalen NK-Zellen . .	28
3.3.7	Durchflusszytometrische Quantifizierung seneszenten NK-Zellen .	30
3.3.8	Quantifizierung der Seneszenzrate mittels [¹⁸ F] FPyGal <i>tracer</i> . .	33
3.3.9	Zytotoxizitätsassay	34
3.3.10	Induktion eines DNA-Schadens durch γ -Strahlung	35
3.4	Proteinbiochemische Methoden	35
3.4.1	Zellyse	35
3.4.2	Proteinbestimmung	35
3.4.3	Western Blotting	36
3.4.4	WES - Automatisierter Immunoassay (Simple Western™)	39
3.4.5	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen	40
3.4.6	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen nach indu- ziertem DNA-Schaden	40
3.4.7	Immunpräzipitation von SLy1	41
3.5	Statistische Analysen	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Phänotypische Analyse von SLy1 ^{KO} und SLy1 ^{KO} p53 ^{KO} NK-Zellen . . .	43
4.1.1	NK-Zellzahl	43
4.1.2	Apoptose	47
4.1.3	<i>In vitro</i> Überlebensfähigkeit	49
4.1.4	Expression von Oberflächenrezeptoren	50
4.1.5	Zytotoxizität	56
4.1.6	Zelluläre Seneszenz	58
4.2	Proteinbiochemische Analyse von SLy1 ^{KO} und SLy1 ^{KO} p53 ^{KO} NK-Zellen	64
4.2.1	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen	64
4.2.2	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in Thymo- zyten nach induziertem DNA-Schaden	72
4.2.3	SLy1 - ein Substrat der Kinasen ATM und ATR?	78

5	Diskussion	81
5.1	Diskussion der phänotypischen Untersuchungen	81
5.1.1	NK-Zellzahl	82
5.1.2	Apoptose	83
5.1.3	Expression von Oberflächenrezeptoren	84
5.1.4	Zytotoxizität	88
5.1.5	Zelluläre Seneszenz	90
5.2	Diskussion der proteinbiochemischen Untersuchungen	92
5.2.1	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen	92
5.2.2	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in Thymo- zyten nach induziertem DNA-Schaden	95
5.2.3	SLy1 - ein Substrat der Kinasen ATM und ATR?	97
5.3	Klinische Relevanz und Ausblick	97
6	Zusammenfassung	99
7	Literaturverzeichnis	100
8	Anhang	110

Abbildungsverzeichnis

1	Struktur von SLy1	9
2	Funktion von SLy1 in NK-Zellen	11
3	DDR Signalkaskade	13
4	Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen	27
5	<i>Gating</i> -Strategie für pulmonale NK-Zellen	30
6	<i>Gating</i> -Strategie für seneszente NK-Zellen	32
7	Schematische Darstellung der Seneszenzquantifizierung mittels β -Gal <i>tracer</i>	33
8	Schematische Darstellung des Zytotoxizitätsassays und <i>Gating</i> -Strategie für LLC-Zellen	34
9	Auswertung der DDR Proteine mit Image Lab	38
10	Schematische Darstellung des WES Immunoblots	39
11	NK-Zellzahl in der Lunge	44
12	Splenozytenzahl und NK-Zellzahl nach MACS-Isolation	46
13	Zellgröße und Granularität von pulmonalen NK-Zellen	47
14	Apoptotische NK-Zellen in der Lunge	48
15	Überlebensfähigkeit von Milz-NK-Zellen	49
16	Aktivierende Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen	52
17	Inhibierende Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen	54
18	Zytotoxizität gegenüber LLC-Zellen	57
19	Repräsentative Histogramme der Seneszenzfärbung	59
20	Quantifizierung seneszenten NK-Zellen in der Lunge	60
21	Quantifizierung seneszenten NK-Zellen in der Milz	61
22	Quantifizierung seneszenten NK-Zellen mittels β -Gal <i>tracer</i>	63
23	Expression der DDR Proteine in NK-Zellen (WB)	65
24	Expression der DDR Proteine in NK-Zellen (WES)	67
25	Relative Expression der DDR Proteine in NK-Zellen	68
26	p53 und Mdm2 in NK-Zellen (WES)	70
27	Induktion eines DNA-Schadens	73

Abbildungsverzeichnis

28	ATR und Chk1 in bestrahlten Thymozyten	75
29	ATM und Chk2 in bestrahlten Thymozyten	76
30	p53 und Mdm2 in bestrahlten Thymozyten	77
31	Immunpräzipitiertes SLy1 nach der Ponceau S Färbung	78
32	SLy1 - ein ATM/ATR Substrat?	79
33	Versuchsablauf mit SLy1-Immunpräzipitation	80
34	NK-Zellen und LLC-Zellen in der 96- <i>well</i> Platte	89
35	Zytotoxizität gegenüber LLC-Zellen	90
36	Potentieller Mechanismus der SLy1 ^{KO} -induzierten NK-Dysfunktion . . .	93
37	WES <i>lane view</i> von p-Chk2 und Chk2	94
38	Anteil der NK-Zellen in der Lunge	110
39	Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren, Referenzpopulation	111
40	Expression von inhibierenden Oberflächenrezeptoren, Referenzpopulation	112
41	Quantifizierung seneszenten NK-Zellen in Milz und Lunge	113
42	WES Chemilumineszenzdiagramme der DDR Proteine	114
43	WES Chemilumineszenzdiagramme von p53 und Mdm2	115

Tabellenverzeichnis

1	Geräte	16
2	Verbrauchsmaterialien	17
3	Chemikalien und Kits	17
4	Puffer, Lösungen und Medien	18
5	Primer	19
6	Zelllinien	19
7	Antikörper für Western Blots	20
8	Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie	21
9	Beschreibung der verwendeten Genotypen	23
10	PCR Reagenzienmix	24
11	PCR Protokolle	25
12	Antikörperkonzentrationen für Durchflusszytometrie	29
13	Antikörperkonzentrationen für Western Blots	37
14	Expression von Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen	55
15	Quantifizierung seneszenten NK-Zellen mittels $C_{12}FDG$	62
16	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen	71
17	Expression und Phosphorylierung von p53 und Mdm2	71
18	Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in bestrahlten Thy- mozyten	116

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	<i>Ataxia teleangiectasia mutated (kinase)</i>
ATR	<i>Ataxia teleangiectasia and Rad3 related (kinase)</i>
AUC	<i>Area under the curve</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
C ₁₂ FDG	5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranosid
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Chk1 bzw. 2	<i>Checkpoint Kinase 1 bzw. 2</i>
Ci	Curie (Einheit)
COPD	<i>Chronic obstructive pulmonary disease</i>
CPM	<i>Counts per minute</i>
Da	Dalton (Einheit)
ddH ₂ O	deionisiertes und destilliertes H ₂ O
DDR	<i>DNA damage response</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
¹⁸ F-FPyGal	2-Fluorin-18 Fluoro-3-pyridinyl- β -D-Galactopyranosid
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FDG	Fluordesoxyglucose
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
gMFI	<i>Geometric mean fluorescence intensity</i>

Tabellenverzeichnis

Gy	Gray (Einheit)
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate lymphoid cell</i>
IP	Immunpräzipitation
IPC	<i>Internal PCR control</i>
IRBC	<i>Impaired ribosome biogenesis checkpoint</i>
ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activating motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
kDa	Kilodalton (Einheit)
KIR	<i>Killer immunoglobulin-like receptors</i>
KLRG1	<i>Killer Cell Lectin Like Receptor G1</i>
KO	Knockout
LDK	<i>Lung Dissociation Kit</i>
LLC-Zelle	<i>Lewis Lung Carcinoma Zelle</i>
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
Mdm2	<i>Mouse double minute 2 homolog (ligase)</i>
MFI	<i>Mean fluorescence intensity</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NKG2A bzw. D	<i>Natural killer group 2 member A bzw. D</i>
NKp46	NK-Zell-Protein mit 46 Kilodalton
NLS	<i>Nuclear localization signal</i>
NSCLC	<i>Non-small cell lung cancer</i>
p53	Protein mit 53 Kilodalton
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPL5	<i>Large ribosomal protein 5</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute (Medium)</i>
RPS3	<i>Small ribosomal protein 3</i>

Tabellenverzeichnis

RTU	<i>Ready-to-Use</i>
SAM	<i>Sterile alpha motif</i>
Sca-1	<i>Stem cells antigen-1</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
Ser	Serin
SH3	<i>Src-homology 3</i>
SLy	<i>SH3 Lymphocyte protein</i>
SPF	spezifisch pathogenfrei
SSC	<i>Side scatter</i>
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TGF- β	<i>Transforming growth factor-β</i>
TIGIT	<i>T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
WB	Western Blot
WT	Wildtyp

1

Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen biologischen Prozessen, Mechanismen und Immunzellen, die fein aufeinander abgestimmt zusammenarbeiten, um den Organismus vor Krankheiten zu schützen. Es hat sich im Laufe der Evolution über Jahrtausende entwickelt und ist in der Lage, eine breite Palette an pathogenen Erregern, Krebszellen und weiteren Gefahren zu erkennen und zu bekämpfen.

Das Immunsystem lässt sich in einen angeborenen und einen erworbenen Teil gliedern. Unter der angeborenen (auch unspezifischen) Immunantwort fasst man neben den Zellen des unspezifischen Immunsystems auch physikalische und chemische Mechanismen wie beispielsweise die Haut, den Hustenreflex oder die Magensäure sowie humorale Abwehrmechanismen, die auf der Funktion und Interaktion von Proteinen bestehen, zusammen. Zellen des unspezifischen Immunsystems haben angeborene unspezifische Fähigkeiten zur Elimination von Erregern und reagieren sehr schnell. Dazu zählt man unter anderem Granulozyten, Monozyten, dendritische Zellen und Makrophagen. Auf ihrer Oberfläche besitzen sie *Toll-like receptors* (TLRs), mit denen sie *pathogen-* oder *danger-associated patterns* erkennen können. Dies können chemische Strukturen von pathogenen Erregern oder von geschädigtem Gewebe freigesetzte Signale sein. Auch spezialisiertere Zellen wie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und andere angeborene lymphoide Zellen (*innate lymphoid cells*, ILCs), die zur direkten Zytolyse in der Lage sind, werden zum unspezifischen Immunsystem gezählt.

Die erworbene Immunantwort erfolgt durch B- und T-Zellen. Anstelle von unspezifischen *patterns* erkennen ihre Rezeptoren spezifisch ein bestimmtes Antigen. Sie werden aktiviert, wenn ihnen pathogene Antigene von antigenpräsentierenden Zellen des unspezifischen Immunsystems präsentiert werden. Nach der Aktivierung laufen in der Regel verschiedene Schritte wie Proliferation und Produktion von Antikörpern ab. Spezifische Immunzellen sind dadurch in ihrer Immunantwort zwar langsamer, diese ist jedoch hochspezifisch und damit meist effektiver.

1.2 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des unspezifischen Immunsystems und werden als eine Unterform der Lymphozyten eingeordnet. Sie besitzen intrazelluläre Granula, die mit verschiedenen zytotoxischen Proteinen gefüllt sind. Die wichtigsten Vertreter sind Perforin und Granzym, welche Poren in der Zellmembran der angegriffenen Zelle formen und damit deren Apoptose auslösen können.

NK-Zellen machen etwa 5-15 % aller Lymphozyten im Blut aus und entwickeln sich aus hämatopoetischen CD34⁺ Stammzellen im Knochenmark. Während ihres Reifeprozesses migrieren NK-Zellen vom Knochenmark und den Lymphknoten ins Blut, die Milz und Leber (Cyster 2005) und erwerben gewebsspezifische Effektorfunktionen (Grégoire et al. 2007). Wie genau dieser Reifeprozess abläuft, ist nicht abschließend geklärt, es wird jedoch davon ausgegangen, dass die noch unreifen NK-Zellen in die Peripherie gelangen, wo sie sich unter dem Einfluss des *Microenvironments* weiterentwickeln. Für Milz-NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese nicht zwangsläufig in der Milz bleiben, sondern durch alle NK-Zellen enthaltenden Organe zirkulieren können (Grégoire et al. 2007). NK-Zellen enthaltende Organe sind unter anderem die Milz, Lunge, Leber, Lymphknoten und der Uterus. In der Milz konzentriert sich ihr Vorkommen vor allem auf die rote Pulpa, genauer gesagt auf die venösen Milzsinusoide (Grégoire et al. 2007).

Humane NK-Zellen lassen sich generell in zwei Subpopulationen unterteilen: die unreifen CD56^{bright} NK-Zellen exprimieren den inhibierenden Rezeptor NKG2A. Sie haben kaum zytolytische Eigenschaften, reagieren jedoch auf Stimulation durch starke Produktion von Zytokinen. Die reifen CD56^{dim} NK-Zellen sind zytolytisch aktiv und haben einen differenzierten Phänotyp. Im peripheren Blut machen sie den Hauptteil der NK-Zellen aus. In der Maus wird CD56 nicht exprimiert, NK-Zellen werden dort meist als CD3⁻NKp46⁺ oder CD3⁻NK1.1⁺ definiert. Jedoch werden NKp46 und NK1.1 auch auf einigen anderen Subtypen der ILCs exprimiert (Tomasello, Yessaad et al. 2012), was die Ergebnisse verfälschen kann. Um präzise Aussagen über die Population der murinen NK-Zellen machen zu können, wurden in dieser Arbeit NK-Zellen als CD3⁻CD49b⁺ Leukozyten definiert.

Murine NK-Zellen werden je nach Reifestadium anhand der Expression von CD11b und CD27 in Subtypen unterteilt (Grégoire et al. 2007). Die eher unreifen CD11b^{low} NK-Zellen finden sich hauptsächlich im Knochenmark und Lymphknoten, die reifen CD27^{low} NK-Zellen hauptsächlich in Blut, Milz und Lunge (Hayakawa und Smyth 2006).

1.2.1 Funktion von NK-Zellen

Die Hauptfunktion von NK-Zellen, welche zu ihrer Namensgebung geführt hat, ist die Zytolyse von Zielzellen. Zu den typischen Zielen von NK-Zellen gehören virusinfizierte und

maligne entartete Zellen. In einer Langzeitstudie an einer japanischen Bevölkerungsgruppe konnte gezeigt werden, dass eine robuste NK-Zellaktivität im peripheren Blut mit reduziertem Risiko einer Tumorerkrankung assoziiert war (Imai et al. 2000). Weitere und nicht zu vernachlässigende Funktionen erfüllen NK-Zellen durch ihre immunmodulatorische Rolle, durch Ausschüttung von Zytokinen oder Chemokinen oder durch die direkte Interaktion mit anderen Immunzellen.

Es gibt zwei Mechanismen, die zur Aktivierung von NK-Zellen führen können: die *missing self* und die *induced self* Aktivierung. Unter der *missing self* Theorie versteht man eine Aktivierung durch fehlende oder mangelhafte Erkennung einer Zielzelle als körpereigen. Zellen exprimieren normalerweise MHC-I (*major histocompatibility complex I*) Moleküle, welche intrazelluläre Proteine präsentieren. Diese stimulieren die inhibierenden NK-Zellrezeptoren und verhindern somit eine Aktivierung. Werden zu wenige oder veränderte MHC-I Moleküle auf einer Zelle exprimiert, kann dies zur Aktivierung von NK-Zellen führen. Unter der *induced self* Theorie versteht man eine Aktivierung durch Erkennung einer Zielzelle als fremd. Kommt es beispielsweise zur malignen Entartung oder Virusinfektion einer Zelle, erfährt diese zellulären Stress und exprimiert zelluläre Stressliganden auf ihrer Oberfläche. Diese führen zur Stimulation von aktivierenden NK-Zellrezeptoren und somit zur Aktivierung der NK-Zelle. NK-Zellen besitzen also durch diese Mechanismen die einzigartige Fähigkeit zwischen fremd und eigen zu unterscheiden.

1.2.2 Oberflächenrezeptoren von NK-Zellen

Auf ihrer Oberfläche weisen NK-Zellen eine Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf.

Aktivierende Rezeptoren, die auf murinen NK-Zellen exprimiert werden, sind zum Beispiel NKG2D, NKp46 und aktivierende Rezeptoren der Ly49 Familie. Sie erkennen gewöhnlicherweise pathogene oder körpereigene Glykoproteine. Der intrazelluläre Teil von einigen aktivierenden Rezeptoren ist mit *immunoreceptor tyrosine-based activating motifs* (ITAMs) assoziiert. Für manche Rezeptoren wie beispielsweise NKG2D ist bekannt, dass sie andere ITAM-unabhängige Signalwege verwenden (J. Wu et al. 1999). Am Ende der Signalkaskaden, welche durch Stimulation von aktivierenden Rezeptoren ausgelöst werden, steht die Degranulation sowie die Transkription von Zytokin- und Chemokingenen (Tomassello, Blery et al. 2000). Für die Aktivierung einer NK-Zelle ist die Stimulation eines einzigen aktivierenden Rezeptors nicht ausreichend. Erst durch die Stimulation mehrerer Rezeptoren kommt es zur Aktivierung und dadurch zur Zytotoxizität (Bryceson et al. 2006).

Inhibierende Rezeptoren wie zum Beispiel CD94-NKG2A und die meisten Vertreter der Ly49 Familie erkennen hauptsächlich die körpereigenen MHC-I Moleküle. Der intrazelluläre Teil der Rezeptoren ist mit einem *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif* (ITIM) assoziiert, worüber eine verminderte Zytokinproduktion sowie eine Hemmung der Proliferation ausgelöst wird. ITIM-vermittelte Folgen der Stimulation von inhibierenden Rezeptoren sind zum Beispiel eine verminderte Adhäsion von NK-Zellen an Zielzellen und eine herabgesetzte Zytotoxizität (Pegram et al. 2010).

NK-Zellen können also gleichzeitig aktivierende und inhibierende Signale erhalten, welche in den intrazellulären Signalwegen verarbeitet und gegeneinander abgewogen werden. Nur wenn die Stimulation der aktivierenden Rezeptoren überwiegt, wird die Zelle tatsächlich aktiviert.

Im Folgenden sollen die wichtigsten Rezeptorfamilien von NK-Zellen kurz vorgestellt werden.

- Die *C-type lectin-like* Ly49 Rezeptoren sind eine große, polymorphe Rezeptorfamilie, die MHC-I Moleküle binden. Darunter gibt es inhibierende Rezeptoren (wie beispielsweise Ly49A) und aktivierende Rezeptoren (wie beispielsweise Ly49H). Humane NK-Zellen exprimieren keine Ly49 Rezeptoren, sondern die strukturell unterschiedlichen *killer immunoglobulin-like receptors* (KIR).
- Die CD94-NKG2 heterodimeren Rezeptoren sind inhibierende Rezeptoren. Im Gegensatz zu Ly49 variiert ihre Expression stark und wird von Zytokinen beeinflusst (Derre et al. 2002). Sie erkennen das nicht-klassische MHC Molekül Qa1^b, worüber sie indirekt die Expression von klassischen MHC Molekülen überwachen können (Vance et al. 1998).
- NKG2D ist ein aktivierender Rezeptor, der nur wenig Ähnlichkeit mit den restlichen NKG2 Rezeptoren besitzt. Er formt kein Heterodimer mit CD94 sondern kommt als Homodimer vor (J. Wu et al. 1999). Seine Liganden sind MHC-I präsentierte Proteine, die in Zusammenhang mit der *DNA damage response* (DDR) Signalkaskade stehen (Groh et al. 1996), sowie weitere zelluläre Stressliganden. Er erkennt dadurch Zellen unter zellulärem Stress und spielt somit eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Tumorwachstum (Guerra et al. 2008).
- Die *natural cytotoxicity receptors* (NCR) bilden eine Rezeptorfamilie, der unter anderem der aktivierende Rezeptor NKp46 angehört. NKp46 spielt eine Hauptrolle in

der Erkennung und Lyse von Tumorzellen (Pessino et al. 1998). Zu seinen Liganden gehören aber auch virale Hämagglutinine, die beispielsweise auf Influenzavirusinfizierten Zellen exprimiert werden.

- NKR-P1 Rezeptoren gehören ebenfalls zur Familie der *C-type lectin-like* Rezeptoren und können aktivierend oder inhibierend sein. Ihr wichtigster Vertreter ist NK1.1, er wird auf nahezu allen NK-Zellen exprimiert und wird häufig als NK-Zell-Marker verwendet.
- Killerzell-Lectin-like-Rezeptor1 (KLRG1) ist ein inhibierender Rezeptor, der ITIM-vermittelte Signalkaskaden auslöst. Seine Liganden sind Cadherine, welche in gesundem Gewebe stark exprimiert sind und dort die Aktivierung von NK-Zellen verhindern (Ito et al. 2006). Neuere Erkenntnisse legen außerdem nahe, dass KLRG1 hauptsächlich von reifen, ausdifferenzierten NK-Zellen exprimiert wird (Huntington et al. 2007). Etwa 30-40 % der NK-Zellen exprimieren KLRG1 (Robbins et al. 2002). KLRG1⁺ NK-Zellen sind weniger aktiv (Robbins et al. 2002) und haben einen reiferen Phänotyp sowie eine geringere Proliferationsrate als KLRG1⁻ NK-Zellen (Huntington et al. 2007). Man geht davon aus, dass die NK-Zellen KLRG1 im Laufe ihrer Entwicklung auf ihrer Oberfläche akkumulieren (Huntington et al. 2007). Gestützt wird die These unter anderem dadurch, dass in Mausmodellen mit erhöhter NK-Zellzahl ein größerer Anteil KLRG1⁺ NK-Zellen beobachtet wurde (Huntington et al. 2007). Nach aktuellem Wissenstand gilt der Nachweis des KLRG1 Rezeptors auf einer NK-Zelle einerseits als Aktivierungsmarker während der akuten NK-Zellaktivierung und andererseits als Marker für seneszente und erschöpfte NK-Zellen nach chronischer Stimulation (Alvarez et al. 2019).

1.2.3 Selbsttoleranz von NK-Zellen

Analog zu anderen Lymphozyten entwickeln NK-Zellen eine Selbsttoleranz. Das bedeutet, dass sie durch spezifische Entwicklungsschritte lernen, körpereigene Zellen nicht zu töten, obwohl sie dazu in der Lage wären. Eine gängige Theorie zur Induktion der Selbsttoleranz von NK-Zellen ist das sogenannte NK-Zell *licensing* (Synonym: NK-Zell *education*) (Yokoyama und Kim 2006). Dabei spielen inhibierende Rezeptoren der Ly49 Familie eine große Rolle, welche in der Lage sind MHC-I vermittelte Antigenpräsentation zu erkennen (Shi et al. 2018). Ein funktionierendes *licensing* stellt sicher, dass nur NK-Zellen, die mindestens einen inhibierenden, MHC-I erkennenden Rezeptor exprimieren, in der Zirkulation vorkommen.

Dieser Prozess erinnert an die T-Zell *education*, die T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen und ist untypisch für Zellen des unspezifischen Immunsystems. Des Weiteren konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass NK-Zellen, genau wie B- und T-Zellen, eine Art immunologisches Gedächtnis entwickeln können (O'Sullivan et al. 2015). Diese Funktion wurde bisher ausschließlich den Zellen des spezifischen Immunsystems zugeschrieben und ihre Entdeckung in NK-Zellen war daher eher überraschend. NK-Zellen werden zwar zu den unspezifischen Immunzellen gezählt, weisen jedoch auch Eigenschaften von spezifischen Immunzellen auf.

1.2.4 NK-Zellen in der Lunge

Die Lunge besteht aus etwa 300 Millionen Lungenbläschen und besitzt eine Oberfläche von $>100 \text{ m}^2$. Damit ist sie eine der wichtigsten Kontaktflächen zwischen Körperinnerem und Außenwelt. Mit jedem Atemzug gelangt eine Vielzahl von Antigenen in die Lunge, die als fremd oder eigen bzw. gefährlich oder ungefährlich erkannt werden müssen. Daneben ist die Lunge auch ein häufig von primären Tumoren oder Tumormetastasen betroffenes Organ sowie Ort weiterer Erkrankungen infektiöser, entzündlicher oder immunpathologischer Genese. Ein präzise abgestimmtes Zusammenspiel von zellulären und humoralen Abwehrsystemen, sezernierten Proteinen und pulmonalen Selbstreinigungsmechanismen ist essentiell für die Integrität der Lunge. Dabei spielen NK-Zellen sowohl als Effektorzellen als auch durch ihre immunmodulatorischen Funktionen eine wichtige Rolle.

In den letzten Jahrzehnten ist das Wissen über NK-Zellen allgemein und insbesondere auch über pulmonale NK-Zellen stark gewachsen. Der Anteil an NK-Zellen in der humanen Lunge ist mit 5-20 % aller CD45^+ Lymphozyten ähnlich hoch wie im Blut (Marquardt, Kekäläinen et al. 2017). In der murinen Lunge ist der Anteil mit etwa 10 % etwas höher als im Blut oder anderen Organen (Grégoire et al. 2007). Die absolute Anzahl der NK-Zellen in der Lunge ist die zweithöchste nach der Milz (Grégoire et al. 2007). Ein möglicher Grund dafür könnte Interleukin-15 sein, welches von bronchialen Epithelzellen spontan gebildet wird und für das Überleben von NK-Zellen unabdingbar ist (Ge et al. 2004).

Pulmonale NK-Zellen haben einen reifen Phänotyp und zeigen im Ruhezustand eine hohe Expression von inhibierenden Oberflächenrezeptoren und eine nur geringe Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren (Wang et al. 2012). Sie exprimieren weniger Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren und sind daher kaum befähigt zu migrieren (Wang et al. 2012). Wie in aktuellen Publikationen gezeigt werden konnte, exprimieren nur etwa 20 % der pulmonalen NK-Zellen den für gewebständige Zellen typischen Oberflächenmarker CD69 (Hervier et al. 2019). Damit ist der Anteil deutlich geringer als beispielsweise in der Leber, wo etwa 50 % der NK-Zellen im Gewebe resident sind (Marquardt, Béziat et al. 2015).

1.2.5 NK-Zell-Dysfunktion

Für eine optimal funktionierende NK-Zell Immunantwort muss die Zusammensetzung der Immunzellen, aber auch die robuste Funktion der einzelnen NK-Zellen gewährleistet sein. NK-Zellen müssen in ausreichend hoher Anzahl vorhanden sein, sie müssen die Zielzelle erkennen und durch sie aktiviert werden. Nach erfolgreicher Aktivierung müssen die intrazellulären Signalkaskaden die ankommenden Signale verarbeiten, transkribieren und translatieren. Es gibt viele Pathomechanismen, die zur Dysfunktion der NK-Zelle und dadurch zu einer eingeschränkten NK-Immunantwort führen können. Im Folgenden sollen die Apoptose, Seneszenz und die NK-Zell *Exhaustion* vorgestellt werden.

Apoptose

Die Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods. Das bedeutet, dass die Einleitung des Zelltodes, im Gegensatz zur Nekrose, durch die Zelle selbst erfolgt. Dieser Prozess kann von außen, zum Beispiel durch andere Immunzellen, oder durch intrinsische Faktoren ausgelöst werden und ist streng kontrolliert. Intrinsische Faktoren, die Apoptose auslösen können, sind beispielsweise DNA-Schäden, osmotischer Stress oder das Fehlen von Wachstumsfaktoren. Über verschiedene intrazelluläre Signalwege kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53, was den Apoptoseprozess in Gang setzt, der über Cytochrom C und verschiedene Caspasen abläuft. Apoptotische Zellen schrumpfen, bilden blasenförmige Ausstülpungen, ihre DNA degradiert und die Mitochondrien werden abgebaut, bevor sich die Zelle in kleine membranumhüllte Apoptosekörperchen auflöst. In gesunden Zellen kommt Phosphatidylserin ausschließlich auf der Innenseite, das heißt auf der dem Zytoplasma zugewandten Seite der Zellmembran vor. Während der Apoptose kommt es zu strukturellen Veränderungen an der Zellmembran im Rahmen derer Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran verschoben wird. Dieses Phosphatidylserin lässt sich nun durch Annexin V Konjugate, welche an das Phosphatidylserin binden, sichtbar machen. So können apoptotische Zellen detektiert werden.

Zelluläre Seneszenz von NK-Zellen

Als zelluläre Seneszenz bezeichnet man das biologische Phänomen, das beschreibt, dass Zellen nach einer gewissen Lebenszeit aufhören, sich weiter zu teilen. Seneszenz wurde in den 1960er Jahren von Hayflick et al. erstbeschrieben, bis dahin dachte man, dass sich Zellen beliebig oft teilen können (Hayflick 1965). Tatsächlich werden bei jeder Zellteilung die Telomere an den Enden der Chromosomen kürzer, was sie irgendwann zum Stillstand einer weiteren Proliferation und damit zur replikativen Seneszenz zwingt. Zellen können aber auch unabhängig von der Anzahl der Zellteilungen in Seneszenz gehen, beispielsweise

nach dem Auftreten von schwerwiegenden DNA-Schäden. Werden DNA-Strangbrüche erkannt, kommt es zur Aktivierung der DDR Signalkaskade und verschiedener Reparaturmechanismen. Können die Schäden dadurch nicht behoben werden, kann dies die endgültige Blockade des Zellzyklus zur Folge haben. Dies ist ein Schutzmechanismus, um genomische Instabilität zu verhindern. Im Gegensatz zur Apoptose bleiben seneszente Zellen am Leben und sind weiterhin metabolisch aktiv, sie können sich jedoch nicht mehr teilen.

Der Phänotyp von seneszenten NK-Zellen wurde von Streltsova et al. durch mehrwöchige Kultur und Interleukin-Stimulation untersucht. Dabei beobachteten die Autoren eine vermehrte Expression von NKG2A und einen Verlust des Reifemarkers CD57 (Streltsova et al. 2018). Diese phänotypischen Seneszenzmerkmale wurden jedoch von anderen Autoren in Frage gestellt, die zeigen konnten, dass durch die Methode der Zellexpansion CD57⁻ NK-Zellen überproportional schnell wachsen und daher die CD57⁺ verdrängen (Lopez-Vergès et al. 2010). Die gängige Methode zur Quantifizierung seneszenten Zellen ist der Nachweis einer verstärkten β -Galactosidase Aktivität.

NK-Zell *exhaustion*

Exhaustion beschreibt den Funktionsverlust von Immunzellen durch das Eintreten eines Erschöpfungszustandes der Zelle. In den letzten Jahrzehnten wuchs das Wissen über T-Zell *exhaustion*, ihre klinische Relevanz und therapeutische Umkehrbarkeit (beispielsweise mittels Checkpointinhibitoren) rapide. Neuerdings rückten auch andere Immunzellen wie zum Beispiel NK-Zellen, über deren phänotypische Merkmale der *exhaustion* weit weniger bekannt ist, in den Fokus der Forschung. NK-Zell *exhaustion* wurde im Zusammenhang mit verschiedenen Krebsarten, CMV-Infektion und chronischer Zytokinstimulation beschrieben und als *exhaustion* Marker wurde in der Regel die Expression von PD-1 verwendet (Judge et al. 2020). Da *exhaustion* nach chronischer NK-Zell Aktivierung auftritt, wird es als selbstregulierender Mechanismus gesehen, der eine überschießende NK-Zell Reaktion verhindern soll. Um eine NK-Zelle als *exhausted* zu definieren wird in der Literatur häufig eine Dysfunktion (meist definiert über herabgesetzte Zytotoxizität oder IFN- γ -Produktion) zusammen mit erhöhter Expression eines etablierten *exhaustion* Markers wie PD-1, TIGIT oder KLRG1 verwendet (Judge et al. 2020). PD-1 ist der typische T-Zell *exhaustion* Marker, seine Expression auf erschöpften NK-Zellen ist jedoch umstritten (Alvarez et al. 2019).

1.3 Das Adaptorprotein SLy1

Adaptorproteine haben im Gegensatz zu vielen anderen Proteinen keine katalytischen Eigenschaften, besitzen jedoch eine Bindungsdomäne, an der andere Proteine andocken können. Dadurch werden die Proteine in räumliche Nähe zueinander gebracht und Protein-Protein Interaktionen werden erleichtert. Zur Familie der SLy/SASH-Adaptorproteine gehören drei strukturell sehr ähnliche Proteine: SLy1 und SLy2 (SH3 protein expressed in lymphocytes 1 bzw. 2) und SASH1 (SAM and SH3 domain containing 1). Im Folgenden soll auf SLy1 eingegangen werden, welches im Jahr 2001 als erstes Familienmitglied entdeckt wurde (Beer, Simins et al. 2001).

SLy1 kommt ausschließlich in Lymphozyten vor und das SLy1-Gen ist X-chromosomal gelegen. Das murine SLy1 ist 381 Aminosäuren lang (Beer, Simins et al. 2001) und hat eine Größe von 55 kDa (Astoul et al. 2003). Am N-Terminus besitzt SLy1 eine zweigeteilte Kernlokalisierungssequenz (*nuclear localization signal*, NLS). Etwa in der Mitte liegt eine SH3 Domäne, welche für Protein-Protein Interaktionen wichtig ist und am C-terminalen Ende besitzt SLy1 eine SAM Domäne, welche Homo- und Heterodimerisierungen mediiert. Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Struktur von SLy1.

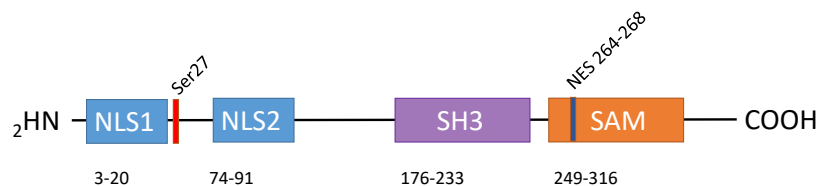


Abbildung 1. Struktur von SLy1

Schematische Darstellung der Struktur von SLy1 nach einer Abbildung von Arefanian et al. 2016. NLS=*nuclear localization signal*, SH3=*Src-homology 3*, SAM=*Sterile alpha motif*

SAM Domänen von anderen Proteinen können mRNA binden (Aviv et al. 2003). Der SAM Domäne von SLy1 fehlen allerdings einige Basenreste, die für die Bindung von mRNA notwendig sind (Arefanian et al. 2016). Es ist daher trotz SAM Domäne unwahrscheinlich, dass SLy1 ein RNA-bindendes Protein ist und wahrscheinlich, dass es durch Protein-Protein-Interaktionen seine Funktion erfüllt.

Auch auf klinischer Ebene gibt es erste vielversprechende Publikationen über SLy1. Delmonte et al. analysierten das Genom von Patienten mit X-chromosomalem, kombiniertem Immundefekt und konnten zeigen, dass diese fehlerhafte SLy1 Varianten aufweisen (Delmonte et al. 2021). Bei den vier nicht verwandten Patienten fand sich eine B- und NK-Zell Lymphopenie sowie teilweise auch eine T-Zell Lymphopenie, welche eindeutig auf ein

fehlerhaftes SLy1 Protein zurückzuführen waren. Es wird vermutet, dass die NK-Zellen aus SLy1-defizienten Patienten Defekte bezüglich der NK-Zell Funktion und Rezeptorexpression sowie ein vermindertes Überleben aufweisen.

1.3.1 SLy1 in NK-Zellen

In T- und B-Zellen konnte SLy1 sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen werden (Beer, Scheikl et al. 2005). Im Gegensatz dazu kommt es in NK-Zellen ausschließlich im Zytoplasma vor (Arefanian et al. 2016). In NK-Zellen dient SLy1 als multifunktionales Adaptorprotein und stabilisiert die Ribosomen (Arefanian et al. 2016). Da NK-Zellen nach ihrer Aktivierung sofort Granzym B, Perforin und weitere Enzyme herstellen müssen, besitzen sie einen großen Pool an Ribosomen (Arefanian et al. 2016) und sind auf ribosomale „Stützproteine“ wie SLy1 angewiesen. Sowohl in der Co-Immunpräzipitation als auch in der RNA Separation mittels Dichtegradienten war SLy1 mit ribosomalen Proteinen, insbesondere dem vollständig gebildeten 80S Komplex assoziiert (Arefanian et al. 2016). In weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurden Hinweise gefunden, dass SLy1 Bindungen zu diversen ribosomalen Proteinen eingehen kann (Kraft 2022).

NK-Zellen, in denen kein SLy1 exprimiert wird (SLy1-Knockout (SLy1^{KO}) NK-Zellen) weisen deutliche funktionelle Defizite auf: sie zeigen eine verminderte Produktion von IFN- γ , eine verminderte Degranulation im Antikörper-Stimulations-Assay und eine verminderte *in vitro* und *in vivo* Lyse von Tumorzellen (Arefanian et al. 2016). Auch phänotypische Defizite wie eine erhöhte Apoptoserate und eine dysfunktionale Aktivierbarkeit von reifen peripheren NK-Zellen wurden beschrieben (Arefanian et al. 2016). In der Entwicklung und im *licensing* von NK-Zellen (siehe Kapitel 1.2.3) scheint SLy1 dagegen keine Rolle zu spielen (Arefanian et al. 2016). Außerdem war SLy1 in CD122⁺ NK-Vorläuferzellen im Knochenmark nicht nachweisbar, woraus sich schließen lässt, dass es nur in differenzierten NK-Zellen vorkommt (Arefanian et al. 2016).

Ribosomale Instabilität

Bei Abwesenheit von SLy1 kommt es in NK-Zellen zu ribosomaler Instabilität und dadurch zur Bildung freier ribosomaler Proteine, unter anderem des *small ribosomal protein 3* (RPS3) und *large ribosomal protein 5* (RPL5) (Arefanian et al. 2016). In gesunden Immunzellen kommen ribosomale Proteine ausschließlich innerhalb der vollständig gebildeten Ribosomen vor. Das Vorkommen von freien ribosomalen Proteinen ist pathologisch und es konnte gezeigt werden, dass RPL5-haltige Komplexe den *impaired ribosome biogenesis checkpoint* (IRBC), einen p53-abhängigen Zell-Zyklus Checkpoint aktivieren und einen

G1 Arrest hervorrufen (Pelletier, Thomas et al. 2017).

Freie ribosomale Proteine stören die Bindung von Mdm2 an p53 und verhindern damit den regelhaften Abbau von p53. An immunpräzipitiertem Mdm2 aus SLy1^{KO} NK-Zellen fand sich weniger p53 gebunden als an Mdm2 aus WT-NK-Zellen. Außerdem waren an immunpräzipitiertem Mdm2 aus SLy1^{KO} NK-Zellen größere Mengen RPL5 und weitere ribosomale Bestandteile gebunden (Arefanian et al. 2016).

P53 akkumuliert also durch die Bildung freier ribosomaler Proteine in den NK-Zellen und führt zur Herunterregulation von aktivierenden Rezeptoren, zur Dysfunktion, Apoptose und letzten Endes zur erhöhten Krebsanfälligkeit des Organismus (Arefanian et al. 2016). Abbildung 2 zeigt eine Schemazeichnung nach einer Abbildung von Arefanian et al. 2016, die den Zusammenhang zwischen ribosomaler Instabilität und dem Auftreten von Apoptose und Seneszenz darstellt. EOMES codiert für den Transkriptionsfaktor Eomesodermin, ist ein Hauptregulator der NK-Zell-Entwicklung (Gordon et al. 2012) und seine Herunterregulation in SLy1^{KO} NK-Zellen soll auch verantwortlich für eine reduzierte Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren sein (Arefanian et al. 2016).

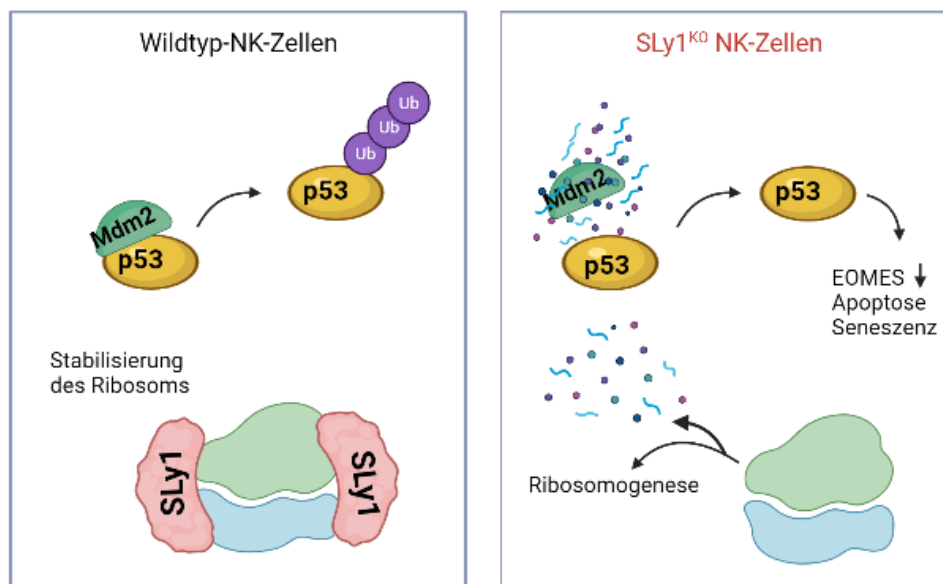


Abbildung 2. Funktion von SLy1 in NK-Zellen

Schematische Darstellung der Funktion von SLy1 in SLy1^{WT/KO} NK-Zellen nach einer Abbildung von Arefanian et al. 2016. Ub=Ubiquitin

In einer amerikanischen Studie konnte außerdem an Krebszellen gezeigt werden, dass ein Komplex aus freien ribosomalen Proteinen und Mdm2 eine p53-abhängige Induktion von Seneszenz nach sich zog (Fregoso et al. 2013).

1.4 *DNA damage response*

In jeder menschlichen Zelle entstehen etwa 10.000-100.000 Mal pro Tag Schädigungen der DNA. Die Schäden besitzen unterschiedliche Ausmaße, die von kleinen Veränderungen einer einzelnen Base bis zum kompletten Bruch beider Stränge reichen können. Als Folge eines DNA-Schadens werden zelluläre Mechanismen aktiviert, die man als *DNA damage response* (DDR) bezeichnet. Am Ende dieser Mechanismen steht die unmittelbare Reparatur des Schadens. Ist der Schaden jedoch irreparabel, kommt es zur Aktivierung von Signalwegen, die entweder durch Induktion von Apoptose das Überleben der Zelle kontrollieren oder die weitere Replikation der Zelle verhindern (Seneszenz). Ziel der DDR Signalkaskade ist in jedem Fall die Integrität des Genoms sicherzustellen.

Nach Detektion eines DNA-Schadens durch sogenannte Sensor-Komplexe kommt es zur Aktivierung der Signaltransduktoren ATR (*Ataxia telangiectasia and Rad3-related protein*) oder ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*), welche die Signalmediatoren Chk1 oder Chk2 (*Checkpoint kinase 1 bzw. 2*) phosphorylieren. Diese phosphorylieren und aktivieren wiederum p53 und andere Effektoren. Die ATR-Chk1 Kaskade wird durch Einzelstrangbrüche und die ATM-Chk2 Kaskade durch Doppelstrangbrüche aktiviert (Abbildung 3). Es bestehen jedoch Quervernetzungen zwischen den beiden Signalwegen. Ist die Zelle erheblichem genotoxischen Stress ausgesetzt, kommt es zur gleichzeitigen Aktivierung beider Signalwege. Abbildung 3 zeigt eine schematische Darstellung der DDR Signalkaskade.

1.4.1 Einzelstrangbrüche und die ATR/Chk1 Kaskade

Einzelstrangbrüche in der DNA werden innerhalb von Sekunden durch die Zelle detektiert. Dies geschieht durch Bindung eines Sensor-Komplexes an die durch den Bruch entstandenen freien Strangenden. Daraufhin wird ATR, eine etwa 300 kDa große Kinase, an die entsprechende Stelle rekrutiert und bindet an den Komplex, wodurch die Kinase aktiviert wird. Der genaue Mechanismus der Aktivierung von ATR ist nicht abschließend geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass es nach einem DNA-Schaden zur Phosphorylierung an Ser428 kommt (Smith et al. 2010). Neuere Arbeiten konnten allerdings eine Autophosphorylierung an Thr1989 zeigen (S. Liu et al. 2011). ATR wird auch aktiviert, wenn es zu Blockierungen der Replikationsgabel kommt, eine Aktivierung kann deshalb auch in Zellen unter replikativem Stress beobachtet werden.

ATR verlässt nach der Aktivierung den Zellkern ins Zytoplasma, wo es die Kinase Chk1 phosphoryliert und damit aktiviert. Die 56 kDa große Kinase Chk1 wird daraufhin in den Zellkern verschoben. Sie gilt als Regulator der Replikation, da sie den Übergang von der G2-Phase in die Mitose verhindern kann. Die Phosphorylierung von Chk1 geschieht an

Ser317, Ser345 und durch Autophosphorylierung auch an Ser296. Durch die Phosphorylierung kommt es zu einer Strukturänderung, wodurch das aktive Zentrum der Kinase zugänglich wird.

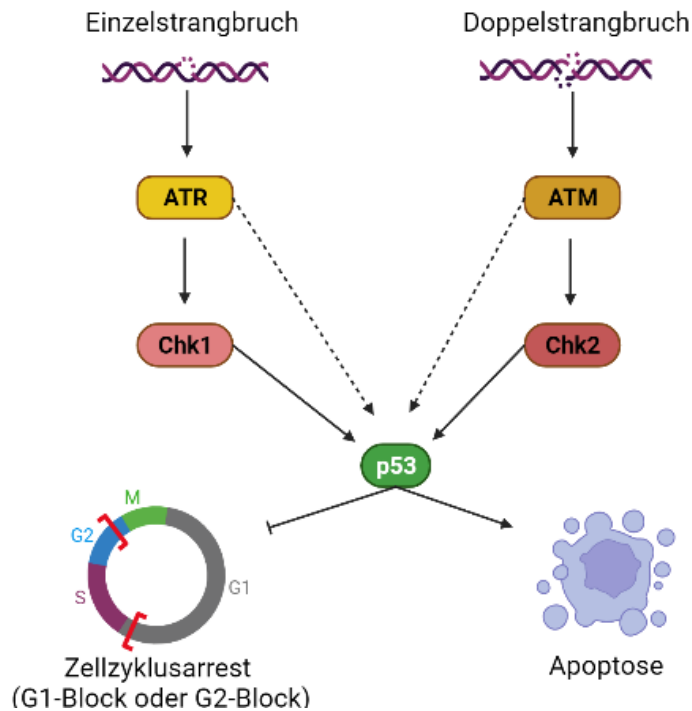


Abbildung 3. Schematische Darstellung der DDR Signalkaskade

Einzelstrangbrüche aktivieren p53 über ATR/Chk1, Doppelstrangbrüche über ATM/Chk2. Es bestehen auch Querverbindungen zwischen den beiden Wegen (nicht dargestellt). Eine Aktivierung von p53 führt zum Zellzyklusarrest und zur Reparatur der Schäden. Irreparable Schäden haben die Apoptose der Zelle zur Folge.

1.4.2 Doppelstrangbrüche und die ATM/Chk2 Kaskade

Als Doppelstrangbruch bezeichnet man einen Bruch beider DNA-Stränge. Ein solcher kann zum Beispiel durch ionisierende Strahlung oder durch freie Radikale entstehen. An den frei liegenden Strangenden bilden sich Proteinkomplexe, welche die Kinase ATM aktivieren. ATM ist ein 350 kDa großes Protein, das im inaktiven Zustand als Homodimer vorliegt. Wird es aktiviert, kommt es zur Autophosphorylierung an Ser1981 und weiteren Aminosäuren und das Protein dissoziiert in aktive Monomere. Das somit aktivierte ATM besitzt eine Vielzahl von Substraten, zu denen Tumorsuppressoren, Zellzyklusproteine und DNA-Reparaturproteine zählen. So aktiviert es beispielsweise die Histone H2AX und macht das Chromatin somit für Reparaturproteine zugänglich. Dadurch wird eine Reparatur durch homologe Rekombination bzw. nicht-homologe Endverknüpfung ermöglicht. Gelingt die Reparatur, überlebt die Zelle und setzt die Proliferation fort.

Chk2 besitzt eine Molekülmasse von 62 kDa und ist ebenfalls ein Substrat von ATM. Die Kinase besitzt am N-Terminus einige Phosphorylierungsstellen, worunter Thr68 eine zentrale Rolle spielt. Eine Phosphorylierung führt zur Homodimerisierung, weiteren Autophosphorylierungen und vollständigen Aktivierung der Kinase (Ahn et al. 2002). Wie auch Chk1 gehört Chk2 zu den Checkpointkinasen, die den Zellzyklus in der S-Phase oder G2-Phase arretieren und dadurch eine Reparatur durch homologe Rekombination initiieren können.

1.4.3 p53 und Mdm2

Seit seiner Erstbeschreibung 1979 wurde das Tumorsuppressorprotein p53 intensiv erforscht und gilt heute als Hauptregulator der zellulären Stressantwort und als „Wächter des Genoms“. Es steht am Ende der oben beschriebenen DDR Signalkaskade und fungiert als deren Effektor. Es wird nicht nur von Chk1 und Chk2 aktiviert, sondern kann auch von den in der Kaskade darüberstehenden Kinasen ATM und ATR direkt aktiviert werden (Chen et al. 2005). Das 53 kDa große Protein liegt im inaktiven Zustand an seinen Inhibitor Mdm2 gebunden vor. Es besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit von 20-30 min. Mdm2 wirkt auch hemmend auf die Transkription von p53. Wird p53 phosphoryliert, löst es sich von Mdm2 und geht in seine aktive Form über. Die Phosphorylierung als Folge eines DNA-Schadens findet unter anderem an den Aminosäuren Ser15, Ser20 (Chk 1/2) und Ser37 (ATM/ATR) statt (Hirao et al. 2000). Bei großen bzw. irreparablen DNA-Schäden erfolgt eine anhaltende Aktivierung von p53 durch ATM/ATR und Chk1/2. Dadurch akkumuliert p53 und die Proliferation der Zelle wird verhindert. Dies kann in Form eines G1- oder G2-Blocks oder durch Einleitung von Apoptose erzielt werden. Neben der Assoziation zu DNA-Schäden ist eine Akkumulation von p53 auch im Zusammenhang mit Mutationen in ribosomalen Proteinen (McGowan et al. 2008) und ribosomalem Stress unterschiedlicher Genese (Sloan et al. 2013) beschrieben.

Mdm2 ist eine 90 kDa große E3 Ubiquitin-Ligase und der wichtigste Regulator von p53. Wenn p53 durch Mdm2 ubiquitiniert wird, führt dies zum sofortigen proteosomalen Abbau von p53. Solange p53 in phosphorylierter Form vorliegt, kann es nicht durch Mdm2 gebunden und abgebaut werden. Hohe p53-Spiegel fördern die Expression von Mdm2, so wird ein Absinken des p53 Spiegels gewährleistet, sobald dieses nicht mehr aktiv ist. Mdm2 selbst kann durch die Kinase Akt an Ser166 und Ser186 phosphoryliert werden, wodurch der Abbau von p53 beschleunigt wird (Zhou et al. 2001).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

SLy1^{KO} Mäuse weisen eine geringere Anzahl an Milz-NK-Zellen auf als Wildtyp-Mäuse. Die wenigen vorhandenen Milz-NK-Zellen in SLy1^{KO} Mäusen gehen vermehrt in Apoptose und zeigen sowohl eine verminderte Expression von aktivierenden Oberflächenrezeptoren als auch eine verminderte *in vitro* Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen (Arefanian et al. 2016; Blumendeller 2022).

In der Lunge spielen NK-Zellen eine wichtige Rolle in der Bekämpfung von Infektionen und Tumorgenese sowie in der Aufrechterhaltung eines immunologischen Gleichgewichts (Wang et al. 2012). Ob pulmonale SLy1^{KO} NK-Zellen ähnliche Defizite zeigen, wurde bisher nicht untersucht.

Ziel dieser Dissertationsarbeit ist es, die Auswirkung eines SLy1-Knockouts auf den Phänotyp von pulmonalen NK-Zellen zu untersuchen. Ein Fehlen von SLy1 in NK-Zellen führt zu ribosomaler Instabilität und zur Bildung freier ribosomaler Proteine, welche eine Akkumulation von p53 hervorrufen (Arefanian et al. 2016). Da die Defizite, die SLy1^{KO} NK-Zellen aufweisen, durch p53-vermittelt werden, sollen in dieser Arbeit auch NK-Zellen untersucht werden, die weder SLy1 noch p53 enthalten (SLy1^{KO}p53^{KO}). Das Augenmerk soll dabei auf der NK-Zellzahl, der Expression von aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren sowie dem Anteil apoptotischer, seneszenten und *exhausted* NK-Zellen liegen. Außerdem soll die Zytotoxizität von Milz-NK-Zellen der oben genannten Genotypen gegenüber Tumorzellen *in vitro* untersucht werden.

Interessanterweise wurde in SLy1^{KO} NK-Zellen auch eine verstärkte mRNA Expression der DDR Gene Atr und Chek1 nachgewiesen (Blumendeller 2022). Im zweiten Teil dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob das erhöhte Vorliegen von p53 in SLy1^{KO} NK-Zellen allein auf die Interaktion freier ribosomaler Proteinen mit Mdm2 zurückzuführen ist oder ob zusätzlich eine verstärkte Aktivierung der DDR Signalkaskade vorliegt. Außerdem soll ein Protokoll etabliert werden, um mittels γ -Strahlung eine Aktivierung der DDR Signalkaskade in Lymphozyten zu erzielen.

In B- und T-Zellen wird SLy1 nach Stimulation der B- oder T-Zellrezeptoren durch eine Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K), Proteinkinase C, oder eine Proteinkinase C-abhängige Kinase phosphoryliert (Beer, Scheikl et al. 2005). Im dritten Teil dieser Arbeit soll daher eine mögliche Phosphorylierung von SLy1 durch die PI3K-related Kinasen ATM und ATR untersucht werden.

2

Materialien

In den Tabellen 1 - 3 findet sich eine Auflistung der verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien und Chemikalien. Tabelle 4 zeigt die Inhaltsstoffe der verwendeten Puffer, Tabelle 5 die PCR Primer und Tabelle 6 die im Zytotoxizitätsassay verwendete Zelllinie. Die eingesetzten Antikörper für Western Blots sind in Tabelle 7 und die für die durchflusszytometrischen Analysen in Tabelle 8 aufgelistet.

Tabelle 1. Verwendete Geräte

Gerät	Artikelnr.	Hersteller	Firmensitz
2-D Electrophoresis Cell Mini	1652960	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
BD FACSCanto™ II	338962	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
Casy Cell Counter Model TT		Roche Innovatis	Basel, Schweiz
Centrifuge 5810 R	5811000015	eppendorf	Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5417 R		eppendorf	Hamburg, Deutschland
Dry Bath dual block	FB15103	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Geldryer Model 583	1651745	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
gentleMACS™ Octo Dissociator	130-095-937	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschl.
HC Power Supply	1645052	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
Inkubator HeraCell		Heraeus	Hanau, Deutschland
MACS MultiStand	130-042-303	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschl.
Mikroskop PrimoVert		Zeiss	Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge Pico™ 17	75002401	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
QIAxcel	9001941	Qiagen	Hilden, Deutschland
Rollenmischer RM5	60207-0070	CAT	Ballrechten, Deutschland
RS 225 X-Ray Research System		Gulmay MS	Krefeld, Deutschland
Schüttler Unimax 2010	542-10020-00	Heidolph	Schwabach, Deutschland
Sterilbank Heraeus	HA2448GS	Heraeus	Hanau, Deutschland
VersaDoc™ Imaging System	4000183	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
Vortex-Genie™ 2	SI-0256	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Wasserbad W12		medingen	Dresden, Deutschland
Zählkammer Neubauer	40441	Hecht Assistent	Sondheim, Deutschland

2. Materialien

Tabelle 2. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller	Firmensitz
4–15% Mini-PROTEAN TGX Gels, 10-well, 50 µl	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
MACS® SmartStrainers	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschland
Microplatte 24 Well Cell Culture Plate	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Microplatte für Suspensionskultur, 96 well, F-Boden	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Nitrocellulose-Membran Amersham™	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
WES 12-230 kDa Jess/Wes Separation Module	ProteinSimple	San Jose, California, USA
WES 66-440 kDa Jess/Wes Separation Module	ProteinSimple	San Jose, California, USA
WES Anti-Mouse Detection Module	ProteinSimple	San Jose, California, USA
WES 20X Anti-Rabbit HRP Conjugate	ProteinSimple	San Jose, California, USA
Zellkulturflasche T25 No690175	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturflasche T75 No658175	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Zellsieb 70 µm Falcon	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 3. Verwendete Chemikalien und Kits

Chemikalie/Kit	Hersteller	Firmensitz
Annexin V Binding Buffer (10X)	BD Biosciences	Heidelberg, Deutschland
APS Ammonium persulfate	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
BSA, heat shock fraction, pH 7	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
cOmplete™, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor	Roche	Mannheim, Deutschland
DC Protein Assay	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
DirectPCR Lysis Reagent	Viagen Biotech	Los Angeles, California, USA
DMSO	Merck	Darmstadt, Deutschland
Glycin 3908.2	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
Isofluran CP 1 ml/ml	cp-pharma	Burgdorf, Deutschland
Lung Dissociation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschl.
Methanol	Honeywell	Morristown, New Jersey, USA
Milchpulver	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
NK Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladbach, Deutschl.
PhosSTOP™	Roche	Mannheim, Deutschland
Pierce™ Protein G Agarose	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Precision Plus Protein™ Dual Color	Bio-Rad Lab.	München, Deutschland
ReBlot Strong Stripping Solution	Merck Millipore	Billerica, Massachusetts, USA
ROTI®Load 4x konz.	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
ROTIPHORESE®Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
ROTI®Stock 20 % SDS	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
SignalFire™ Elite ECL	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
TEMED Tetramethylethylenediamine	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA
Tris 5429.2	Carl Roth	Karlsruhe, Deutschland
TWEEN® 20	Sigma Aldrich	St. Louis, Missouri, USA

2. Materialien

Tabelle 4. Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

Comassie Entfärbelösung	200 ml Essigsäure 100 % 400 ml Methanol 1,4 l ddH ₂ O
DMEM für Lymphozyten	DMEM + 5% FCS + 2 mM L-Glutamin
DMEM für NK-Zellen	DMEM + 10% FCS + 1% P/S + 1% L-Glutamin + 0,05 mM β -Mercaptoethanol
Erythrozyten-Lysepuffer	0,155 M NH ₄ Cl 0,01 M KHCO ₃ 0,1 mM EDTA 500 ml ddH ₂ O
MACS-Puffer	PBS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺) + 0,5% BSA + 2 mM EDTA
NP-40-Lysepuffer	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl 1 % NP-40 2 mM EDTA (pH 7,86)
Runningbuffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin 0,1 % SDS 1000 ml ddH ₂ O (pH 8,3)
RPMI für Lymphozyten	RPMI + 5% FCS + 1% P/S + 1% L-Glutamin + 0,05 mM β -Mercaptoethanol
Sammelgel	1,875 ml Acrylamid Gel 30 6,25 ml Sammelgelpuffer (4X) 0,125 ml 20 % SDS 4,118 ml ddH ₂ O 0,0075 ml TEMED 0,1 ml 12,5 %APS

2. Materialien

Sammelgelpuffer (4X)	0,5 M Tris (60,57 g) 500 ml ddH ₂ O (pH 6,8)
TBST (1X)	50 mM TrisHCL 150 mM NaCl 0.1% Polysorbate 20 (Tween 20) (pH 7,5)
Transferpuffer	2,5 mM Tris 19,2 mM Glycin 900 ml ddH ₂ O 100 ml Methanol absolut
Trenngel (10 %)	8,33 ml Acrylamid Gel 30 6,25 ml Trenngelpuffer (4X) 0,125 ml 20 % SDS 10,03 ml ddH ₂ O 0,0125 ml TEMED 0,2 ml 12,5 %APS
Trenngelpuffer (4X)	1,5 M Tris (181,71 g) 500 ml ddH ₂ O (pH 8,8)

Tabelle 5. Verwendete Primer und PCR Produkte

IPC = *Internal PCR control*, fwd = *forward*, rev = *reverse*

Primer	5'-3' Sequenz	Hersteller	Firmensitz
IPC (fwd)	caaatgttgcttgctggg	biomers.net	Ulm, Deutschland
IPC (rev)	gtcagtcgagtcacagttt	biomers.net	Ulm, Deutschland
NCR-Cre (fwd)	gaccatgatgctgggttgcccagatg	biomers.net	Ulm, Deutschland
NCR-Cre (rev)	atcggtgggctctatggcttctg	biomers.net	Ulm, Deutschland
p53flox (fwd)	ggtaaaccagcttgacca	biomers.net	Ulm, Deutschland
p53flox (rev)	ggaggcagagacagttggag	biomers.net	Ulm, Deutschland
SLy1 Primer 3 (for)	tgacggcagtaggatggttag	biomers.net	Ulm, Deutschland
SLy1 Primer 4 (neo-rev)	cgccttctgacgagttctct	biomers.net	Ulm, Deutschland
SLy1 Primer 6 (rev-wt)	agtggcctgggggagatgt	biomers.net	Ulm, Deutschland
Taq-Polymerase, Buffer, MgCl ₂ , dNTPs		Bioline (by Meridian Bioscience)	Cincinnati, Ohio, USA

Tabelle 6. Verwendete Zelllinie

Zelllinie	Hersteller	Firmensitz
LL/2 (LLC1) ATCC® CRL-1642™	ATCC	Manassas, Virginia, USA

Tabelle 7. Verwendete Antikörper für Western Blots

Antigen	Artikelnr.	Hersteller	Firmensitz
Anti-Mouse Immunglobulins/HRP	P0161	Dako	Glostrup, Dänemark
Anti-rabbit IgG, HRP-linked	7074	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
ATM (D2E2)	2873	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
ATR (E1S3S)	13934	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
β -Aktin	ab8227	abcam	Cambridge, Großbritannien
Chk1 (2G1D5)	2360	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Chk2	2662	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Mdm2 (SMP14) HRP	sc-965 HRP	Santa Cruz Biot.	Dallas, Texas, USA
p53 (1C12)	2524	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Phospho-ATM (Ser1981)	AM1-2020	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Phospho-ATM/ATR Substrate Motif [(pS/pT) QG]	6966	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Phospho-ATR (Ser428)	2853	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Phospho-Chk1 (Ser317)(D12H3)	12302	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Phospho-Chk2 (Thr68)	MA5-27988	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
Phospho-Mdm2 (Ser166)	3521	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Phospho-p53 (Ser15)	12571	Cell Signaling	Cambridge, Großbritannien
Rabbit IgG light chain (HRP)	ab99697	abcam	Cambridge, Großbritannien
SLy1 (Ag: EP051037)	SA4456-57	Eurogentec	Seraing, Belgien
Vinculin	MAB6896	R&D Systems	Minneapolis, Minnesota, USA

2. Materialien

Tabelle 8. Verwendete Antikörper und Farbstoffe für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Artikelnr.	Hersteller	Firmensitz
7-AAD	559925	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
C ₁₂ FDG (5-Dodecanoylamino fluorescein Di- β -D-Galactopyranosid)	D2893	Thermo Fisher	Waltham, Massachusetts, USA
CD3e Pacific Blue™ Hamster Anti-Mouse	558214	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD16/32 Ultra-LEAF™	101339	BioLegend	San Diego, California, USA
CD45.2 FITC Mouse Anti-Mouse	553772	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD45.2 PE Mouse Anti-Mouse	560695	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD49b APC Hamster Anti-Mouse	558295	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD69 PE Hamster Anti-Mouse	553237	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD94 PE Mouse Anti-Mouse	130-104-038	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladb., Deutschl.
CD159a (NKG2A) Antibody, anti-mouse, PE	130-120-377	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladb., Deutschl.
CD314 PE Rat anti-Mouse	558403	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
CD335 (NKp46) PE Rat Anti-Mouse	560757	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
IgG1 κ Isotype Control PE Hamster	553972	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
KLRG1 PE Hamster Anti-Mouse	561621	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
Ly-6A/E (Sca-1) PE anti-mouse	122507	BioLegend	San Diego, California, USA
Ly-49A Antibody, anti-mouse, PE	130-102-876	Miltenyi Biotec	Bergisch-Gladb., Deutschl.
Ly-49H PE Mouse Anti-Mouse	562206	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
NK-1.1 PE Mouse Anti-Mouse	557391	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland
V500 Annexin V	561501	BD Bioscience	Heidelberg, Deutschland

3

Methoden

3.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden Mausmodelle aus zwei verschiedenen Stämmen verwendet. Beide Stämme basieren auf einem C57BL/6 Hintergrund. Alle Mäuse wurden in der Tierhaltung „Pharmakologie/Toxikologie“ der Universität Tübingen gezüchtet und gehalten. Dies erfolgte unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in offener Käfighaltung. Im Alter von 3-4 Wochen wurden die Jungtiere von ihren Eltern getrennt und genotypisiert (Kap. 3.2.1). Alle durchgeführten Experimente mit Versuchstieren wurden nach nationalen Standards durchgeführt und durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt (Anz. 26.04.18).

3.1.1 SLy1^{WT/KO} Mäuse

Generierung und Phänotyp des SLy1^{WT/KO} Stammes wurden bereits beschrieben (Reis et al. 2009). Der SLy1^{WT/KO} Stamm ermöglicht es, Auswirkungen des Fehlens von SLy1 in NK-Zellen zu analysieren.

3.1.2 SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäuse

Um zu untersuchen, ob die im SLy1^{KO} Stamm beobachteten Auswirkungen über p53 reguliert werden, wurde der Stamm p53^{fl/fl}Ncr1-Cre^{+tg}SLy1^{KO} verwendet. Für die Generierung des p53^{fl/fl}Ncr1-Cre^{+tg}SLy1^{KO} Stammes wurden zunächst SLy1^{KO}p53^{fl/fl} Mäuse generiert. Diese Mäuse wurden in einem weiteren Schritt mit Mäusen verpaart, die unter dem NK-Zell-spezifischen Promotor Ncr1 die Cre-Rekombinase exprimieren (Eckelhart et al. 2011). In NK-Zellen, in denen die Cre-Rekombinase exprimiert wird (aus Ncr1-Cre^{+tg} Mäusen) kommt es so zu einem Knockout von p53. P53 ist in Ncr1-Cre^{+tg} NK-Zellen nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbar (Abbildung 26B, S.70). In Mäusen, in denen keine Cre-Rekombinase exprimiert wird (Ncr1-Cre^{+/+} Mäuse) entspricht der Phänotyp weitestgehend dem SLy1^{KO} Phänotyp. Als Kontrollen für die Knockout-Mäuse dienten SLy1^{WT} bzw. p53^{fl/fl}Ncr1-Cre^{+tg}SLy1^{WT} Mäuse gleichen Alters. Der Vergleich von p53^{fl/fl}

3. Methoden

Ncr1-Cre^{+/+} SLy1^{WT} mit SLy1^{WT} Mäusen bzw. p53^{fl/fl} Ncr1-Cre^{+/+} SLy1^{KO} mit SLy1^{KO} Mäusen beispielsweise bezüglich der NK-Zellzahl in peripheren Organen zeigte, dass die Einführung der flox-Stelle keinen Einfluss auf den Phänotyp hatte (Abbildung 11 und 12, Seite 44 bzw. 46).

Tabelle 9 zeigt eine Übersicht über die verwendeten Genotypen.

Tabelle 9. Beschreibung der verwendeten Genotypen

Die letzten zwei Spalten beziehen sich auf die Expression des angegebenen Proteins in NK-Zellen.

Genotyp	Kurzform	Beschreibung	SLy1	p53
SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{WT}	Wildtyp	✓	✓
SLy1 ^{KO}	SLy1 ^{KO}	Knockout von SLy1	✗	✓
p53 ^{fl/fl} Ncr1-Cre ^{+/+} SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{WT} p53 ^{WT}	Das p53 Gen ist auf beiden Allelen gefloxt. Cre-Rekombinase wird nicht exprimiert. SLy1 Wildtyp.	✓	✓
p53 ^{fl/fl} Ncr1-Cre ^{+/+} SLy1 ^{KO}	SLy1 ^{KO} p53 ^{WT}	Das p53 Gen ist auf beiden Allelen gefloxt. Cre-Rekombinase wird nicht exprimiert. Knockout von SLy1.	✗	✓
p53 ^{fl/fl} Ncr1-Cre ^{+tg} SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{WT} p53 ^{KO}	Das p53 Gen ist auf beiden Allelen gefloxt. In NK-Zellen wird die Cre-Rekombinase exprimiert und führt zum NK-Zell-spezifischen Knockout von p53. SLy1 Wildtyp.	✓	✗
p53 ^{fl/fl} Ncr1-Cre ^{+tg} SLy1 ^{KO}	SLy1 ^{KO} p53 ^{KO}	Das p53 Gen ist auf beiden Allelen gefloxt. In NK-Zellen wird die Cre-Rekombinase exprimiert und führt zum NK-Zell-spezifischen Knockout von p53. Knockout von SLy1.	✗	✗

3.1.3 Aufbereitung der Organe

Die Tötung der Mäuse erfolgte durch zervikale Dislokation unter vorheriger Betäubung mit Isofluran. Die Organe wurden post mortem präpariert, entnommen und in kaltem *Phosphate buffered saline* (PBS) auf Eis gelagert.

Die Milz bzw. der Thymus wurden mechanisch durch einen 70 µm Nylonfilter gedrückt, um eine Zellsuspension zu erhalten.

Die Lunge wurde semi-automatisch und standardisiert mit Hilfe des *Lung Dissociation Kits* von Miltenyi laut des im Datenblatt bereitgestellten Protokolls aufbereitet. Dafür wurden die Lungen direkt nach der Entnahme im gentleMACS™ *Octo Dissociator with Heaters* im Programm 37C_m_LDK_1 für 31 min bei 37 °C inkubiert. Die Dissoziation in eine Zellsuspension erfolgt dabei mechanisch und enzymatisch.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Genotypisierung der Mäuse

Die Jungtiere aus der Zucht wurden im Alter von 3-4 Wochen mittels Ohrlochung markiert und die dabei gewonnene Gewebeprobe zur Genotypisierung verwendet. Nach der Tötung der Mäuse zu Versuchszwecken erfolgte eine erneute Genotypisierung aus Gewebe der Schwanzspitze. Zur Genotypisierung mittels *Polymerase chain reaction* (PCR) wurde DirectPCR® Lysepuffer laut Herstellerangaben mit Proteinkinase K supplementiert und die Gewebeprobe darin für 6 h bei 55°C inkubiert. Anschließend wurden sie für 1 h bei 85°C inkubiert, um eine Inaktivierung der Proteinase K zu erzielen. Die Proben wurden zentrifugiert und der Überstand bei -20°C gelagert. Die in der PCR verwendeten spezifischen Primer- und Reagenzienmische sind in Tabelle 10 aufgeführt. Tabelle 11 zeigt die verwendeten Cyclerprotokolle. Die amplifizierten PCR Produkte wurden anschließend mit dem DNA- und RNA-Analysegerät QIAxcel separiert und analysiert.

Tabelle 10. PCR Primer- und Reagenzienmix für SLy1, p53 und Ncr1-Cre
10x Buffer = 10x NH₄ Reaction Buffer

SLy1		p53		Ncr1-Cre	
H ₂ O	17,95 µl	H ₂ O	17,90 µl	H ₂ O	18,60 µl
10x Buffer	2,50 µl	10x Buffer	2,50 µl	10x Buffer	2,50 µl
MgCl ₂ 50 mM	1,25 µl	MgCl ₂ 50 mM	1,00 µl	MgCl ₂ 50 mM	0,75 µl
dNTPs 10 mM	0,50 µl	dNTPs 10 mM	0,50 µl	dNTPs 10 mM	0,50 µl
Primer 3 (fwd) 100 µM	0,80 µl	Primer p53flox (fwd) 10 µM	1,00 µl	Primer Ncr1-Cre (fwd) 10 µM	0,50 µl
Primer 4 (neo-rev) 100 µM	0,40 µl	Primer p53flox (rev) 10 µM	1,00 µl	Primer Ncr1-Cre (rev) 10 µM	0,50 µl
Primer 6 (rev-wt) 100 µM	0,40 µl			Primer IPC (fwd) 5 µM	0,25 µl
				Primer IPC (rev) 5 µM	0,25 µl
Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,20 µl	Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,10 µl	Taq-Polymerase (5 units/µl)	0,15 µl

Tabelle 11. PCR Protokoll für SLy1, p53 und Ncr1-Cre

SLy1		p53		Ncr1-Cre	
95°C	3 min	94°C	3 min	94°C	5 min
30 Zyklen:		34 Zyklen:		30 Zyklen:	
95°C	15 s	94°C	30 s	94°C	30 s
64°C	30 s	60°C	30 s	57°C	40 s
72°C	95 s	72°C	60 s	72°C	60 s
72°C	10 min	72°C	10 min	72°C	5 min

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Bestimmung der Zellzahl

Primäre Zellen wurden manuell mit der Zählkammer nach Neubauer gezählt. Dafür wurden die in Suspension befindlichen Zellen 1:10 mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Die durch Trypanblau angefärbten Zellen wurden als tot definiert und nicht mitgezählt. Aus den Werten von drei bis vier gezählten Großquadraten wurde der Mittelwert gebildet und die vorhandene Zellkonzentration bzw. Zellzahl berechnet. Kulturzellen wurden maschinell mit Hilfe des CASY Zellzählers laut Herstelleranweisung gezählt.

3.3.2 Zellkultur

Alle Arbeiten mit Kulturzellen wurden unter sterilen Bedingungen unter Verwendung der Sterilbank durchgeführt. Die Zellen der LLC-Linie wurden erworben, passagiert und in Passage 5 eingefroren. Dafür wurden $2 \cdot 10^6$ Zellen in 1 ml Medium mit 10 % DMSO resuspendiert. Die Zellen wurden 24 h bei -80°C gelagert und dann in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C im Wasserbad erwärmt und in 19 ml Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zentrifugiert ($300 \times g$, 3 min, 4°C), der Überstand verworfen und je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 20 ml Medium in eine T75 Zellkulturflasche mit Filterdeckel ausgesät. Die LLC-Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde zunächst das Medium abgesaugt. Der Flaschenboden wurde vorsichtig mit 5 ml PBS abgespült und das PBS ebenfalls abgesaugt. Auf die adhärent wachsenden LLC-Zellen wurde 1 ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05 %/0,02 %) gegeben und die Zellen durch leichtes Klopfen gelöst. Nach 30 Sekunden wurden 9 ml Medium zugegeben und die Zellen anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in 20 ml Medium resuspendiert und in eine frische Zellkulturflasche ausgesät.

3.3.3 Erythrozytenlyse

Eine Erythrozytenlyse wurde vor allen durchflusszytometrischen Versuchen mit primären Zellen und vor der Zelllyse für proteinbiochemische Versuche durchgeführt. Dafür wurden die Zellen in 3 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 ml kaltem PBS abgestoppt und die Zellen anschließend zentrifugiert (500 xg, 5 min, 4 °C). Vor der NK Isolation mittels *Magnetic activated cell sorting* (MACS) wurde keine Erythrozytenlyse durchgeführt.

3.3.4 *Magnetic activated cell sorting* (MACS)

Zur Isolation der NK-Zellen mittels MACS wurde laut des im Datenblatt bereitgestellten Protokolls vorgegangen. Dafür wurden die Nicht-NK-Zellen mit magnetischen MicroBeads des *NK Cell Isolation Kits* markiert. Die Zellsuspension wurde auf LS Säulen gegeben, die sich im magnetischen Feld des MACS Separators befanden. In den Säulen verblieben die mit MicroBeads markierten Zellen und die unmarkierten NK-Zellen wurden unterhalb der Säulen aufgefangen. Dabei wurden maximal 10^8 Zellen auf eine LS Säule gegeben, um eine Übersättigung der Säule zu vermeiden.

Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle

Die Reinheit der NK-Zellen nach der MACS Isolierung wurde stichprobenartig mittels Durchflusszytometrie überprüft. Dafür wurden 50 000 Zellen in ein FACS Röhrchen überführt und gewaschen. Die Fc-Rezeptoren wurden blockiert und die Zellen anschließend mit einem Färbemix aus CD45.2-FITC (1:100), CD3e-PacBlue (1:200) und CD49b-APC (1:400) für 25 min auf Eis inkubiert. NK-Zellen wurden definiert als $CD45.2^+CD3e^-CD49b^+$. Durchschnittlich betrug der Anteil der NK-Zellen 86,8 % (n = 34) aller $CD45.2^+$ Zellen.

3.3.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder das *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) dient der automatisierten Untersuchung von Zellsuspensionen mittels Laserlicht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Durchflusszytometrie zur Quantifizierung von NK-Zellen und zur Analyse phänotypischer Zellmerkmale eingesetzt. Neben spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen wurden dafür Antikörper, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (FACS-Antikörper), verwendet.

1. Mittels FACS-Antikörpern gegen NK-zellspezifische Oberflächenrezeptoren wurde untersucht, ob sich ein Knockout von SLy1 auf die Expression dieser Rezeptoren auswirkt (Kap. 3.3.6).
2. Außerdem wurde der Anteil apoptotischer NK-Zellen mittels Annexin V und 7-AAD bestimmt (Kap. 3.3.6).
3. Um zu untersuchen, ob ein SLy1-Knockout Einfluss auf den Anteil seneszenter NK-Zellen hat, wurden diese mit dem Farbstoff C₁₂FDG inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch ausgewertet (Kap. 3.3.7).
4. Bei der Durchführung der Zytotoxizitätsassays (Kap. 3.3.9) wurde der Anteil toter LLC-Zellen nach Ende der Inkubationszeit mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestimmt.

Alle Messungen wurden am Gerät FACSCanto™ II der Firma BD Bioscience durchgeführt. Das Gerät verfügt über drei Laser und ist somit in der Lage, acht unterschiedliche Farbstoffe gleichzeitig zu detektieren. Abbildung 4 zeigt die schematische Funktionsweise der Durchflusszytometrie. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FlowJo.

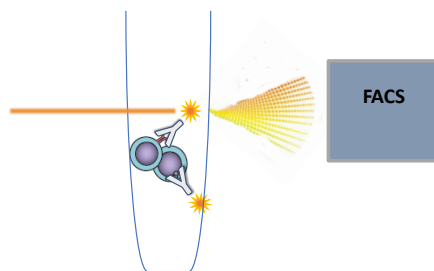


Abbildung 4. Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Analysen

Zellsuspensionen wurden aus der Milz oder Lunge von SLy1^{WT/KO} bzw. SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen angefertigt und mit den entsprechenden Antikörpern bzw. Farbstoffen inkubiert. Nach zwei Waschschritten erfolgte die Analyse am FACS Gerät.

Kompensation: Da sich die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe in ihren Emissionsspektren teilweise überlappen, kann es bei der Messung zur Detektion von falsch positiven Signalen kommen. Um dies zu minimieren, wurde vor Beginn der Versuche eine Kom-

compensation durchgeführt. Dadurch ließen sich die Anteile des Emissionsspektrums, die in einem falschen Kanal gemessen wurden, herausrechnen. Die Kompensation wurde für die Flurochrome FITC, Pacific Blue, APC, PE und V500 mit Hilfe von BD™ Comp-Beads laut Herstellerprotokoll durchgeführt (1 Tropfen Beads auf 100 μ l PBS + 1 μ l FACS-Antikörper). Für die Kompensation des Farbstoffs 7-AAD, der intrazellulär an die DNA bindet, wurden frisch isolierte Splenozyten verwendet. Diese wurden mit FixPerm behandelt, um die Zellmembran für den Farbstoff durchlässig zu machen. Um die erzeugten Poren während der Inkubation mit 7-AAD offen zu halten, wurde der Farbstoff mit WashPerm 1X anstatt PBS verdünnt (2,5 μ l 7-AAD auf 100 μ l WashPerm). Der Farbstoff C₁₂FDG wurde für die Kompensation durch einen FITC-Antikörper in der Konzentration 1:150 ersetzt.

3.3.6 Durchflusszytometrische Analyse von pulmonalen NK-Zellen

Die Lungen wurden, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, aufbereitet und größere Gewebeteile über einen 70 μ m Filter entfernt. Anschließend wurde eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Jeweils $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden in ein FACS Röhrchen überführt und einmal mit PBS gewaschen. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren erfolgte mit 1 μ g/ μ l CD16/CD32 Antikörper für 10 min auf Eis. Um ein *gate* auf NK-Zellen (definiert als CD45.2⁺ CD3e⁻ CD49b⁺) setzen zu können, wurden diese mit CD45.2-FITC, CD3e-PacBlue und CD49b-APC inkubiert. CD45 ist ein ubiquitär vorkommendes Membranprotein und wird auf beinahe allen hämatopoetischen Zellen außer reifen Erythrozyten exprimiert. CD3 ist ein Transmembranprotein, welches ausschließlich auf T-Lymphozyten vorkommt. CD49b (oder DX5) wird auf der großen Mehrheit der ausgereiften NK-Zellen exprimiert und eignet sich gut zum *Gating*, da es nicht mausstammspezifisch ist (Arefanian et al. 2016). Pro Röhrchen wurde zudem jeweils einer der folgenden PE-konjugierten Antikörper zugegeben: NKG2D-PE (CD314), NK1.1-PE, NKp46/NCR1-PE (CD335), KLRG1-PE, NKG2A-PE, CD94-PE, Ly49A-PE, Sca-1-PE. Tabelle 12 zeigt die Konzentrationen der verwendeten Antikörper. Die Inkubation erfolgte für 25 min auf Eis. Anschließend folgten zwei Waschschritte und die Apoptose/Nekrose-Färbung. Dafür wurden die Zellen in 100 μ l Annexin binding buffer 1X resuspendiert und mit Annexin V-V500 und 7-AAD (Konzentrationen siehe Tabelle 12) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden 100 μ l Annexin binding buffer zugegeben und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass zwischen Färbung und Messung maximal 30 min lagen.

Tabelle 12. In der Durchflusszytometrie verwendete Antikörperkonzentrationen

Antikörper bzw. Farbstoff	Konzentration
CD3e-PacBlue	1:100
CD45.2-FITC	1:50
CD49b-APC	1:200
CD94-PE	1:10
KLRG1-PE	1:100
Ly49A-PE	1:5
NKG2D-PE	1:100
NK1.1-PE	1:100
NKp46/NCR1-PE (CD335)	1:100
NKG2A-PE	1:50
Sca-1-PE	1:100
V500-Annexin V	1:200
7-AAD	1:40

Gating Strategie: Im ersten Schritt wurde ein *gate* auf Einzelzellen, im nächsten Schritt auf CD45.2⁺ Zellen und dann auf die klar abgrenzbare CD3e⁻ CD49b⁺ NK-Zellpopulation gesetzt. Innerhalb dieser NK-Zellpopulation zeigte sich eine bimodale Verteilung mit einer PE⁺ und PE⁻ Fraktion. Die PE⁺ Population wurde bezüglich ihrer Anzahl (*Frequency of parent*) und *mean fluorescence intensity* (MFI) analysiert. Die PE⁻ Population diente als Referenzpopulation.

Außerdem wurde die NK-Zellpopulation bezüglich ihrer Affinität zu Annexin V und 7-AAD analysiert, um den Anteil apoptotischer NK-Zellen zu quantifizieren. Dabei wurde zwischen früher Apoptose (Annexin V⁺7-AAD⁻) und später Apoptose (Annexin V⁺7-AAD⁺) unterschieden. Abbildung 5 veranschaulicht die *Gating* Strategie und die Einteilung in früh- und spätapoptotische Zellen.

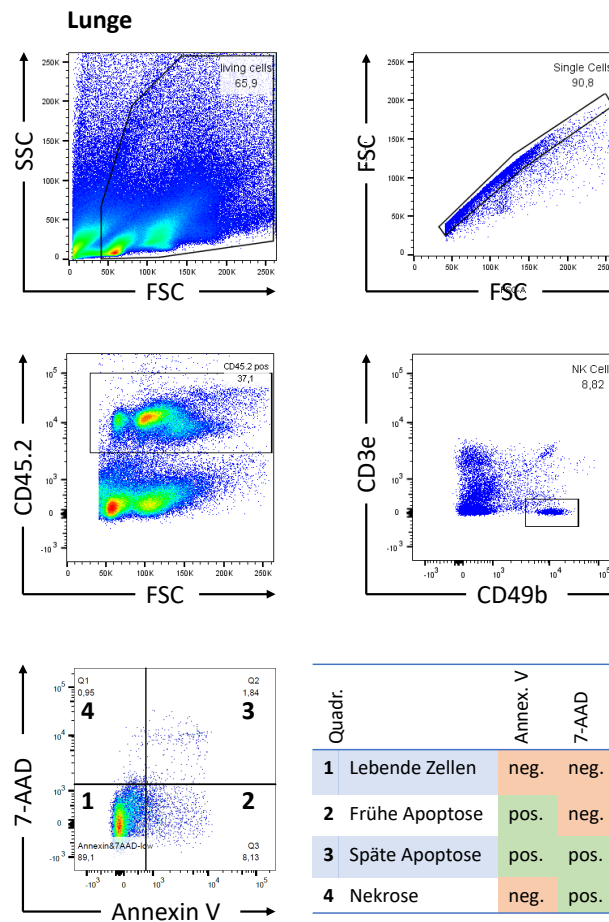


Abbildung 5. Gating-Strategie für pulmonale NK-Zellen

NK-Zellen wurden definiert als $CD45.2^+ CD3e^- CD49b^+$. Apoptose wurde definiert als Annexin V^+ und weiter unterteilt in frühe und späte Apoptose, wie in der Tabelle angegeben.

3.3.7 Durchflusszytometrische Quantifizierung seneszenten NK-Zellen

Zur Quantifizierung seneszenten NK-Zellen erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der β -Galactosidaseaktivität. Dafür wurden die Zellen mit $C_{12}FDG$, einem Substrat der β -Galactosidase, inkubiert. Reagiert es mit dem Enzym entsteht ein fluoreszierender Farbstoff, welcher in der Zelle verbleibt. Die gemessene Intensität des Farbstoffes korreliert also mit der Aktivität der β -Galactosidase und kann somit als Maß für die Seneszenz gesehen werden. Die Versuche wurden analog zu dem von Cahu et al. publizierten Protokoll durchgeführt (Cahu und Sola 2013). Vor Versuchsbeginn erfolgte eine Kompensation der verwendeten Fluorochrome, wie in Kapitel 3.3.5 beschrieben. Die Milz und Lunge wurden, wie in Kap. 3.1.3 beschrieben, aufbereitet und die Zellen in Medium ("RPMI für Lymphozyten", Tabelle 4) resuspendiert. In einer 24-well Zellkulturplatte wurden je well $2 \cdot 10^6$ Zellen in 2 ml Medium ausgebracht und mit 100 nM Bafilomycin A1 inkubiert (1 h bei $37^\circ C$, 5 % CO_2). Anschließend wurden $66 \mu M C_{12}FDG$ zugegeben und die Zellen für

3. Methoden

weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Es wurden jeweils Duplikate sowie eine ungefärbte Kontrolle angefertigt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen in FACS Röhren überführt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Blockierung der Fc-Rezeptoren erfolgte mit $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ CD16/CD32 für 10 min auf Eis. Um ein *gate* auf NK-Zellen (definiert als $\text{CD45.2}^+ \text{CD3e}^- \text{CD49b}^+$) setzen zu können, wurden diese mit CD45.2-PE, CD3e-PacBlue und CD49b-APC inkubiert. Die Inkubation erfolgte für 25 min auf Eis. Anschließend folgten zwei Waschschrte und eine Färbung mit 7-AAD 1:40 für 15 min auf Eis. Im Anschluss wurden $100 \mu\text{l}$ PBS zugegeben und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt.

Gating Strategie: Im ersten Schritt wurde ein *gate* auf Einzelzellen, im nächsten Schritt auf CD45.2^+ Zellen und dann auf die klar abgrenzbare $\text{CD3e}^- \text{CD49b}^+$ NK-Zellpopulation gesetzt. Von dieser NK-Zellpopulation wurden tote (7-AAD^+) NK-Zellen ausgeschlossen. Anschließend wurde die *geometric mean fluorescence intensity* (gMFI) des C_{12}FDG bestimmt und die gMFI der ungefärbten Kontrolle abgezogen. Abbildung 6 zeigt die *Gating* Strategie und das Histogramm einer repräsentativen Probe mit zugehöriger ungefärbter Kontrolle.

3. Methoden

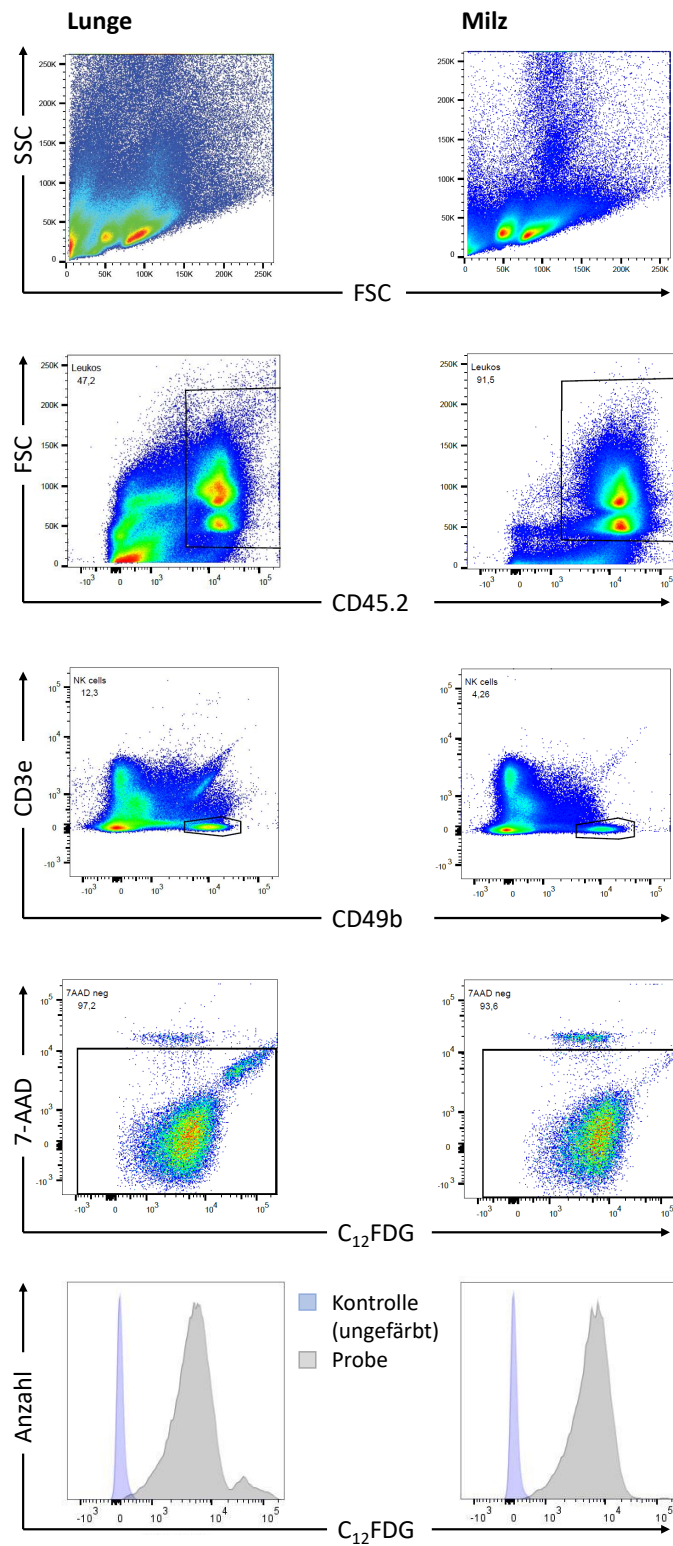


Abbildung 6. Gating-Strategie für seneszente NK-Zellen

Zunächst wurde in den Daten aus der Lunge und Milz ein *gate* auf CD45.2⁺ CD3e⁻ CD49b⁺ NK-Zellen gesetzt. Seneszenz wurde als 7-AAD⁻ C₁₂FDG⁺ definiert. Die unterste Zeile zeigt das Histogramm einer repräsentativen Probe mit zugehöriger ungefärbter Kontrolle.

3.3.8 Quantifizierung der Seneszenzrate mittels [^{18}F] FPyGal *tracer*

Als zweite Methode zur Quantifizierung seneszenten NK-Zellen erfolgte die Inkubation mit dem radioaktiven [^{18}F] FPyGal *tracer*. Dabei handelt es sich um ein Substrat des Enzyms β -Galactosidase, welches mit radioaktivem ^{18}F markiert wurde (Schwenck et al. 2019). Wird der *tracer* intrazellulär durch die β -Galactosidase gespalten, entstehen lipophile Spaltprodukte, die in der Zelle verbleiben. Ungespaltene [^{18}F] FPyGal Moleküle, zum Beispiel in Zellen mit niedriger Galactosidaseaktivität besitzen hydrophile Eigenschaften und verlassen die Zellen wieder. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist die Anreicherung des *tracers* in Zellen, in denen zuvor Seneszenz induziert wurde, erhöht (Schwenck et al. 2019).

Zur Versuchsdurchführung wurden NK-Zellen, wie in Kap. 3.1.3 und 3.3.4 beschrieben, isoliert und jeweils 350 000 Zellen in Medium ("DMEM für Lymphozyten", Tabelle 4) resuspendiert. Anschließend wurden 20 μl [^{18}F] FPyGal *tracer* (Aktivität 1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$) hinzugegeben und inkubiert (45 min bei 37°C auf dem Schüttler mit 90 Umdrehungen/min). Es wurden jeweils Triplikate angefertigt. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben gewaschen und mittels eines γ -counters analysiert. Dieser misst über einen Szintillationskristall die von der Probe emittierte γ -Strahlung. Die Anzahl der radioaktiven Zerfälle pro Sekunde korreliert dabei mit der Menge an aufgenommenem *tracer*. Für die Versuchsdurchführung wurde eine Standardreihe in dreifacher Ausführung von 0,2 μCi bis 20 μCi angefertigt. Als Referenzwert diente ein Röhrchen ohne Zellen, in dem *tracer* mit Medium inkubiert wurde. Dieser Referenzwert wurde von allen gemessenen Werten abgezogen, um unspezifische Bindungen des *tracers* an die Innenwand des Röhrchens zu korrigieren. Abbildung 7 zeigt den schematischen Aufbau des Versuches.

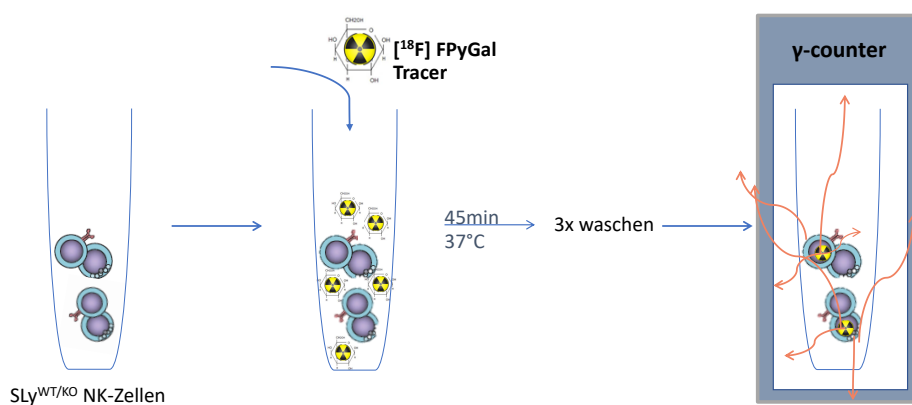


Abbildung 7. Schematische Darstellung der Seneszenzquantifizierung mittels [^{18}F] FPyGal *tracer*

SLy1^{WT/KO} Milz-NK-Zellen wurden frisch isoliert und für 45 min mit dem [^{18}F] FPyGal *tracer* inkubiert. Die Quantifizierung des aufgenommenen *tracers* erfolgte im γ -counter. Die Versuchsdurchführung erfolgte im und mit Unterstützung durch das Werner Siemens Imaging Center des Universitätsklinikums Tübingen.

3.3.9 Zytotoxizitätsassay

LLC-Zellen wurden 24 h vor Versuchsbeginn passagiert und $1 \cdot 10^6$ Zellen in 20 ml Medium ausgesät. Am Tag des Versuchs wurden die LLC-Zellen mit PBS gespült und vom Flaschenboden abgelöst (1 ml Trypsin/EDTA (0,05 %/0,02 %) für 30 Sekunden). Der Ablösevorgang wurde mit 9 ml Medium gestoppt, die Zellen zentrifugiert (300 xg, 3 min, 4 °C) und der Überstand verworfen. Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurden die Zellen resuspendiert und die Zellsuspension durch einen 70 μ m Nylonfilter filtriert. Ob die Zellen nun einzeln vorlagen, wurde mikroskopisch überprüft und der Vorgang gegebenenfalls wiederholt. Anschließend wurden die Zellen auf einer 96-well Platte für Suspensionskultur mit F-bottom ausgebracht (10 000 Zellen/well in 100 μ l Medium).

Die NK-Zellen wurden, wie in Kap. 3.1.3 und 3.3.4 beschrieben, aus der Milz isoliert und anschließend gezählt. Es wurden 250 000 NK-Zellen pro well zu den LLC-Zellen gegeben (Verhältnis 25:1). Dabei wurden je nach verfügbarer Menge an NK-Zellen Duplikate oder Triplikate erstellt. Drei wells mit LLC-Zellen blieben ohne Zugabe von NK-Zellen und dienten als Referenzwerte. Die Platte wurde für 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Abbildung 8A zeigt den schematischen Ablauf der Versuchsdurchführung.

Nach der Inkubationszeit wurde der Inhalt jedes wells in ein FACS Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert und zwei Mal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Apoptose-/Nekrosefärbung mit Annexin V und 7-AAD. Dafür wurden die Zellen in 100 μ l Annexin binding buffer resuspendiert und je Röhrchen 0,5 μ l Annexin V - V500 und 2,5 μ l 7-AAD hinzugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden weitere 100 μ l Annexin binding buffer zugegeben und die durchflusszytometrische Messung durchgeführt.

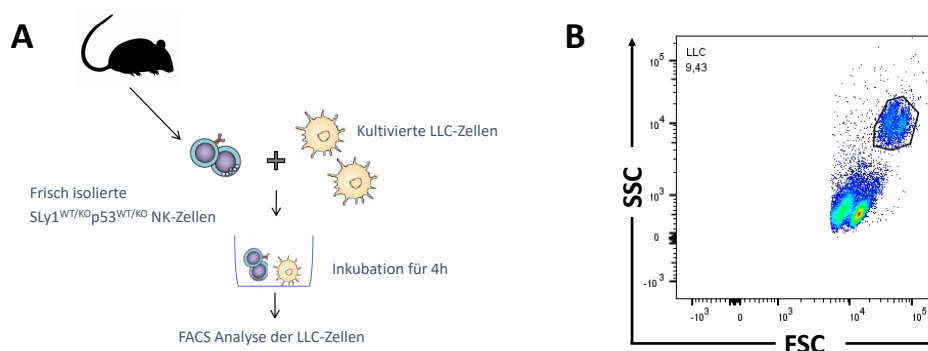


Abbildung 8. Schematische Darstellung des Zytotoxizitätsassays und Gating-Strategie für LLC-Zellen

(A) Schematische Darstellung der Versuchsdurchführung des Zytotoxizitätsassays. (B) Gating auf LLC-Zellen. Die schwarz umkreiste Population entspricht den LLC-Zellen. Die kleineren, weniger granulierten Zellen entsprechen den NK-Zellen.

Gating Strategie: In der *forward -/side scatter* Ansicht zeigten sich zwei klar voneinander abgrenzbare Populationen (Abbildung 8B). Dabei repräsentierte die größere, stärker granuläre Population die LLC-Zellen. Die LLC Population wurde im nächsten *Gating*-Schritt nach Annexin V/7-AAD Positivität dargestellt und ein *gate* auf Annexin V⁺ 7-AAD⁺ LLC-Zellen gesetzt (siehe Abbildung 18, Seite 57).

3.3.10 Induktion eines DNA-Schadens durch γ -Strahlung

Zur Analyse des DDR Signalwegs wurde in Thymozyten mittels γ -Strahlung ein DNA-Schaden induziert. Dafür wurden Thymozyten, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, isoliert und eine Erythrozytenlyse wurde durchgeführt. Anschließend wurden $2 \cdot 10^7$ Zellen in 10 ml supplementiertem DMEM ("DMEM für Lymphozyten", Tabelle 4) resuspendiert und in eine T25 (12,5 cm²) Zellkulturflasche ausgesät. Die Zellkulturflaschen wurden nachfolgend im Bestrahlungsgerät RS 225 platziert und mit einer Dosisrate von 1 Gy/min (200 kV, 15 mA, 0,25 mm Cu-Filter) bestrahlt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Zellyse

Zur Durchführung einer Zellyse wurde Lysepuffer frisch mit 10% Proteaseinhibitor und 10% Phosphataseinhibitor supplementiert. Pro 10^6 Zellen wurden 40 μ l supplementierter Lysepuffer verwendet. Die Zellen wurden für 30 min auf Eis inkubiert und zwischendurch mit dem Vortexmischer aufgewirbelt. Anschließend wurde das Lysat bei 15 000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert und der Überstand in frische Röhrchen überführt. Die Lysate wurden bei -80 °C aufbewahrt.

3.4.2 Proteinbestimmung

Die Quantifizierung der Proteinmenge wurde mittels Absorptionsspektrometrie nach der Lowry-Methode durchgeführt. Die Vorbereitung der Messung wurde laut Herstellerangabe des verwendeten DC Protein Assay Kits (Bio-Rad) durchgeführt. Die Absorptionsspektrometrie erfolgte bei einer Wellenlänge von 560 nm. Gleichzeitig wurde zur Quantifizierung der Proben eine Eichkurve gemessen, die Proteinkonzentrationen von 0 μ g/ μ l bis 2 μ g/ μ l BSA abdeckte. Je Probe wurden Duplikate gemessen, von denen der Mittelwert berechnet wurde.

3.4.3 Western Blotting

Herstellung der Gele: SDS-Gele wurden mit 10 % Acrylamid in einer Dicke von 1 mm mit 10 Taschen hergestellt. Dies geschah in der Regel ein bis zwei Tage vor der Gelelektrophorese. Die Gele wurden dann feucht gehalten und bei 4°C aufbewahrt.

Reduktion mit Laemmli-Puffer: Zur Reduktion der Proteine wurden diese direkt vor dem Beladen der Gele mit 1X Laemmli-Puffer für 10 min bei 95°C inkubiert.

Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE): Die Gele wurden in die Kammer eingespannt und die Geltaschen einmal mit Runningbuffer gespült. Anschließend wurde ein Marker bzw. die reduzierten Proteine in die Taschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte zunächst für 10 min bei 90 V und anschließend für 120 min bei 140 V. Es kamen auch Gradientengele der Firma Biorad zum Einsatz, hier erfolgte die Elektrophorese zunächst für 10 min bei 90 V und dann für 50 min bei 200 V. Vor dem anschließenden Blotting wurden die Gele für 25 min in kaltem Transferpuffer equilibriert.

Wet-Blotting: Mittels Wet/Tank-Blot Verfahren wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Ein elektrisches Feld mit 100 V wurde für 60 min angelegt. Durch Platzierung des Tanks in einer Eiswanne wurde eine übermäßige Erwärmung des Puffers vermieden. Nach Abschluss des Transfers wurde die Membran kurz in ddH₂O gewaschen und dann zur Qualitätskontrolle mit Ponceau S gefärbt. Das Gel wurde nach dem Blottingvorgang für 20 min mit Coomassie-Brillantblau gefärbt und anschließend mit Coomassie-Entfärbelösung entfärbt, um Proteinrückstände im Gel sichtbar zu machen. Anschließend wurde das Gel im Geltrockner durch Anlegen von Hitze und Vakuum getrocknet.

Blocking: Die Membran wurde für 1 h unter leichter Bewegung in TBST mit 5 % Milchpulver geblockt.

Primäre Antikörper: Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte in Milch 5 % + 0,05 % NaN₃ bzw. BSA 5 % + 0,05 % NaN₃ (Konzentrationen der Antikörper siehe Tabelle 13). Dafür wurde die Membran mit der Antikörperlösung in ein 50 ml Röhrchen überführt und über Nacht bei 4°C auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde sie drei Mal für 5 min in TBST auf dem Schüttler von Rückständen befreit.

Sekundäre Antikörper: Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper erfolgte in Milch 5 % in einer Konzentration von 1:2000. Dafür wurde die Membran in ein 50 ml Röhrchen mit Antikörperlösung überführt und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde sie drei Mal für 5 min in TBST auf dem Schüttler gewaschen.

Entwicklung der Membran: Die Entwicklung der Membran erfolgte mit Hilfe des VersaDoc Imaging Systems. Als Chemilumineszenzreagenz wurde SignalFire der Firma CellSignaling verwendet. Dessen Komponenten wurden unmittelbar vor der Belichtung gemischt, die Lösung auf die Membran getropft und für 1 min inkubiert.

Stripping: Für den Nachweis von Phosphorylierungen kamen spezielle Antikörper, die selektiv an phosphorylierte Proteine binden zum Einsatz. Um auf denselben Membranen anschließend das entsprechende unphosphorylierte Protein nachweisen zu können, wurden die Membranen *gestrippt*. Dafür wurden die Membranen 15 min unter starkem Schütteln in *Stripping*-Lösung inkubiert, um die gebundenen Antikörper zu entfernen. Die Membranen wurden anschließend für 10 min in TBST gewaschen und dann 1 h in Milch 5 % geblockt. Es folgte eine *Stripping*-Kontrolle: dafür wurde die Membran erneut 1 h mit sekundärem Antikörper inkubiert und anschließend entwickelt. Stammten beide primären Antikörper (z.B. Phospho-ATM und ATM) jedoch aus unterschiedlichen Spezies wurde die *Stripping*-Kontrolle vereinfacht durchgeführt. Die Membran wurde dann direkt nach dem *Stripping* entwickelt, um zu überprüfen, ob noch sekundäre HRP-gekoppelte Antikörper der ersten Entwicklung zu detektieren waren.

Auswertung der Banden: Die Auswertung der Banden erfolgte mit der Software Image Lab™ (Version 6.0.1, Bio-Rad Laboratories). Abbildung 9 zeigt die Auswertung am Beispiel der Daten des in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Versuchs.

Tabelle 13. Im Western Blot verwendete Antikörperkonzentrationen

AK = Antikörper;

* Mdm2: der verwendete primäre Antikörper war bereits HRP-gekoppelt, deswegen wurde kein sekundärer Antikörper eingesetzt.

Protein	Konz. primärer AK	in:	Konz. sek. Ak	in:
ATM	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
Phospho-ATM	1:1000	BSA 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-mouse 1:2000	Milch 5 %
ATR	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
Phospho-ATR	1:1000	BSA 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
Chk1	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-mouse 1:2000	Milch 5 %
Phospho-Chk1	1:1000	BSA 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
Chk2	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:5000	Milch 5 %
Phospho-Chk2	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
p53	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-mouse 1:2000	Milch 5 %
Phospho-p53	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
Mdm2	1:1000	Milch 5 % ohne NaN ₃	-*	
Phospho-Mdm2	1:1000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %
β-Aktin	1:10000	Milch 5 % + 0,05 % NaN ₃	anti-rabbit 1:2000	Milch 5 %

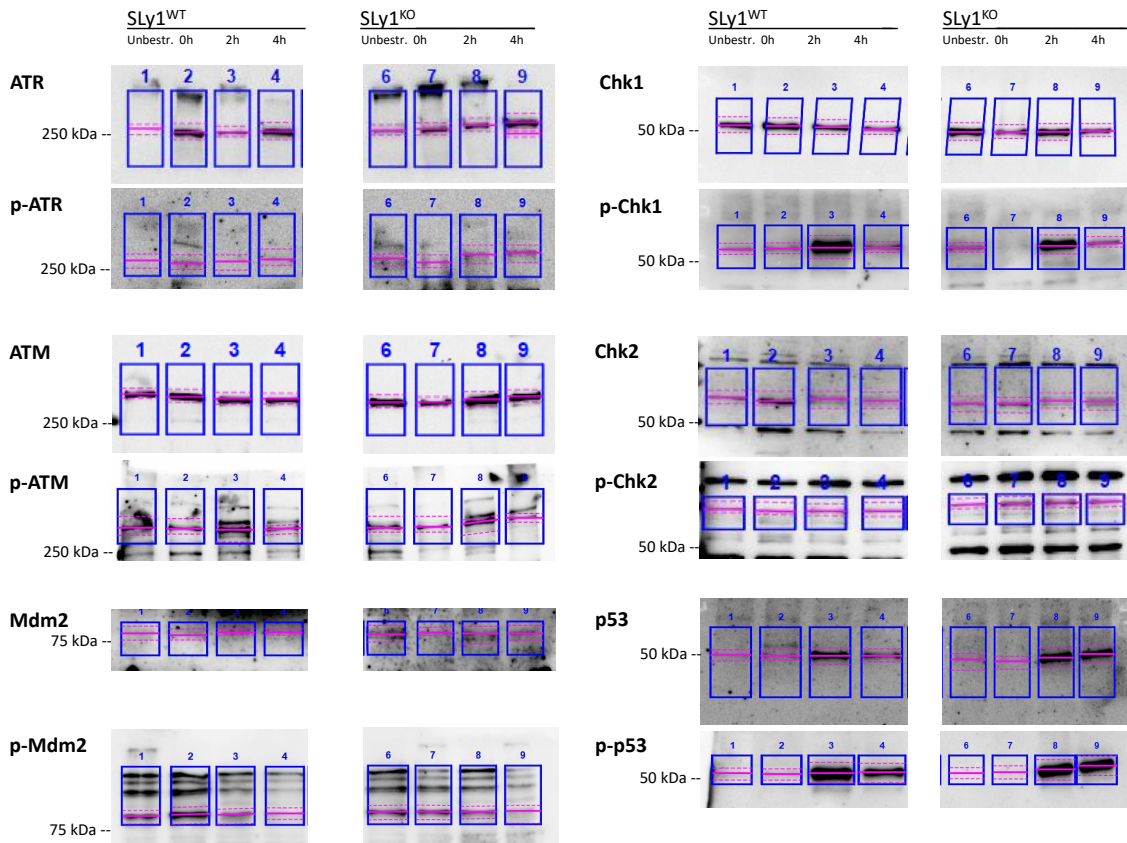


Abbildung 9. Auswertung der Western Blots in Image Lab

Für die Auswertung der Western Blots wurden die Banden manuell mit der Software Image Lab gesetzt. Hier gezeigt am Beispiel der Western Blots der DDR Proteine nach induziertem DNA-Schaden (Kapitel 4.2.2). Die pinke, gestrichelte Linie markiert den Bereich, in dem das Signal ausgewertet wurde. Die erwartete Höhe der Bande wurde durch Verwendung eines Markers ermittelt.

3.4.4 WES - Automatisierter Immunoassay (Simple Western™)

Simple Western™ ist eine automatisierte Western Blot Technik, die Proteine mittels Kapillarelektrophorese separiert und quantifiziert (Nguyen et al. 2011). Die Durchführung des Simple Western™ Blots erfolgte nach dem vom Hersteller bereitgestellten Protokoll. Abbildung 10 zeigt eine schematische Darstellung des Ablaufes in der Kapillare.

Bei der Versuchsdurchführung wurde die *well*-Platte stets unmittelbar vor der Messung befüllt. Für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen wurden 100 000 Zellen/*well* eingesetzt, für alle anderen Proteine 50 000 Zellen/*well*. Primäre Antikörper wurden in der Verdünnung 1:50 verwendet. Anti-Vinculin, das als Ladekontrolle diente, wurde in der Verdünnung 1:100 verwendet. Die Inkubationszeit der primären Antikörper (*Primary Antibody Time*) wurde auf 90 min festgelegt. Als sekundärer Antikörper wurde 20X Anti-Rabbit HRP (1:19) und 1X RTU Anti-Mouse Secondary Antibody verwendet, um die gleichzeitige Detektion von primären Antikörpern unterschiedlicher Spezies zu ermöglichen.

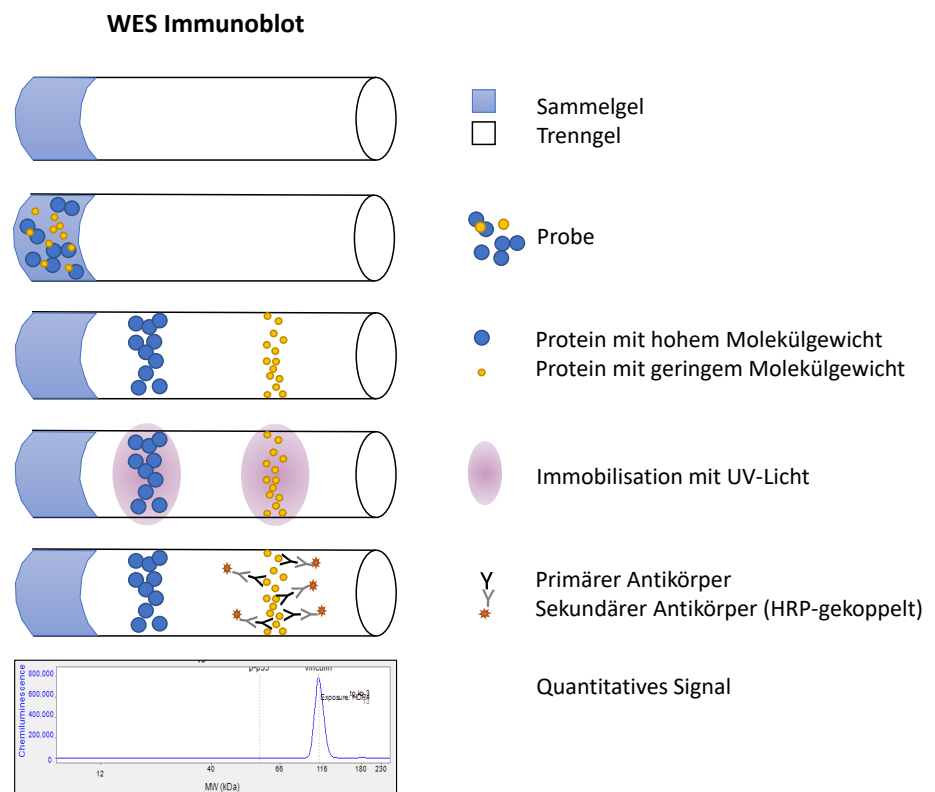


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Ablaufes eines WES Immunoblots

Abbildung nach einer von Simple Western™ veröffentlichten schematischen Darstellung der Abläufe in der Kapillare während des automatisierten Immunoblotverfahrens. Innerhalb der Kapillare befinden sich ein Sammel- und Trenngel, über das die Proteine nach Größe getrennt werden. Auf die Immobilisierung mittels UV-Licht erfolgt die Inkubation mit den primären und sekundären Antikörpern. HRP=Horseradish peroxidase

Die Auswertung erfolgte mit der Software Compass for SW (Version 4.1.0) unter Verwendung der *default* Parameter. Die *peaks* wurden definiert und die *peak find width* manuell an die Breite angepasst. Eine Gaußsche Glockenkurve wurde, wie in Abbildung 42 - 43 (Seite 114 - 115) zu sehen, über die *peaks* gelegt (*peak fit*) und die *Area under the curve* (AUC) berechnet. Bei der Beurteilung der Ergebnisse ist zu beachten, dass sich die Höhe, auf der eine Bande beim WES zu erwarten ist, vom herkömmlichen Western Blot unterscheiden kann.

3.4.5 Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in SLy1^{KO} NK-Zellen

Die Auswirkungen, die ein Knockout von SLy1 auf die Expression und die Phosphorylierung der Proteine ATM, ATR, Chk2, Chk1, p53 und Mdm2 in NK-Zellen hat, wurde mittels klassischem Western Blot und mittels automatisiertem Immunoassay untersucht. Dafür wurden NK-Zellen isoliert (Kapitel 3.1.3, 3.3.4), lysiert (Kapitel 3.4.1) und die Lysate bei -80°C gelagert. Auf eine absorptionspektrometrische Quantifizierung der Proteine wurde aus Materialmangel verzichtet. Klassische Western Blots wurden, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, durchgeführt. Automatisierte Immunoassays wurden, wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben, durchgeführt.

3.4.6 Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen nach induziertem DNA-Schaden

Die Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen wurde 0 h, 2 h und 4 h nach induziertem DNA-Schaden untersucht. Ein DNA-Schaden wurde, wie in Kapitel 3.3.10 beschrieben, induziert. Die Untersuchung der Proteinexpression erfolgte durch klassischen Western Blot, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben. Auf den Membranen wurden zuerst die phosphorylierten Proteine nachgewiesen. Nach erfolgter *Stripping*-Kontrolle (siehe Kapitel 3.4.3) wurden die entsprechenden Gesamtproteinmengen nachgewiesen.

3.4.7 Immunpräzipitation von SLy1

Splenozyten bzw. Thymozyten wurden, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, isoliert. Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Versuche 8 - 12 Wochen alt. Die Splenozyten bzw. bestrahlten Thymozyten wurden unter Inhibition von Proteasen und Phosphatasen lysiert (Kapitel 3.4.1) und die Proteinmenge wurde bestimmt (Kapitel 3.4.2). Die Immunpräzipitation (IP) wurde mit 100 μg Protein pro Probe durchgeführt. Dafür wurden die Proteinlysate für 1 h bei 4 °C auf dem Rotator mit anti-SLy1 Antikörpern inkubiert (Konzentration 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). 40 μl Pierce™ Protein G Agarose Beads wurden 3x mit 1000 μl Lysepuffer gewaschen und in 100 μl supplementiertem Lysepuffer resuspendiert. Die beads wurden zum Proteinlysat gegeben und 1 h bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Anschließend wurden sie bei 900 xg, 1 min, 4 °C zentrifugiert, um das an die beads gebundene SLy1 zu sedimentieren. Vom Überstand (*cleared lysate*) wurden zur Qualitätskontrolle 10 μl abgenommen, mit 20 μl Lysepuffer und 10 μl 1X Sample Buffer 10 min bei 95 °C inkubiert und bei -20 °C aufbewahrt. Die beads mit dem gebundenen SLy1 wurden 3x mit 1 ml Lysepuffer gewaschen. Dann wurde 40 μl 1X Sample Buffer zugegeben und 5 min bei 95 °C inkubiert, um die Proteine zu denaturieren und von den beads zu lösen. Anschließend wurde zentrifugiert und der Überstand mit dem Protein in ein frisches Röhrchen überführt.

Für die *input control* wurde vor der Immunpräzipitation (IP) 4 μg Protein pro Probe abgenommen, mit 1X Sample Buffer 10 min bei 95 °C inkubiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Die Western Blots wurden als SDS-PAGE (10 % Acrylamid, 1,5 mm Dicke, 10 Taschen) durchgeführt. Dafür wurde pro Tasche das IP-Material aus 100 μg Protein geladen. Dieses wurde direkt vor dem Laden der SDS-PAGE weitere 5 min bei 95 °C inkubiert. Die Ladungsmenge für die *cleared lysate* Kontrolle betrug 10 μg und für die *input control* 4 μg . Die Membranen wurden anschließend mit p-ATM/ATR Substrate Antikörper (1:1000 in BSA 5 %) und einem für Ig-Leichtketten spezifischen sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG *light chain specific* 1:10000 in Milch 5 %) inkubiert. Dieser Antikörper zeigt keine Affinität zur *heavy chain* der IgG. Dadurch kann das Auftreten starker Banden auf Höhe von 50 kDa vermieden werden, die durch die heavy chain der zur Immunpräzipitation verwendeten Antikörper zustande kommen würden. Nach dem Entwickeln wurden die Membranen, wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben, *gestrippt* und anschließend mit Antikörpern gegen Phospho-SLy1 (1:1000 in Milch 5 % + 0,05 % NaN₃) bzw. SLy1 (1:1000 in Milch 5 % + 0,05 % NaN₃) inkubiert.

3.5 Statistische Analysen

Alle statistischen Auswertungen basierten auf der Annahme, dass die Daten aus einer normalverteilten Grundgesamtheit stammen. Um dies zu überprüfen, wurden die Daten vor der statistischen Auswertung auf Normalverteilung geprüft. Dafür wurde, wenn möglich, der D'Agostino-Pearson omnibus K2 Test verwendet. War dies aufgrund geringer Probengröße nicht möglich, wurde der Kolmogorov-Smirnov Test mit Dallal-Wilkinson-Lilliefors P value verwendet. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde der natürliche Logarithmus auf den Datensatz angewendet und anschließend der Test wiederholt. Auf extrem abweichende Datenpunkte wurde der Grubbs' test (*extreme studentized deviate* Methode) angewandt, um festzustellen, ob dieser ein Datenpunkt signifikant ($P < 0.05$) von den anderen Datenpunkten abweicht. Gegebenenfalls wurde der Ausreißer entfernt. Pro Datensatz wurde dabei maximal ein Wert entfernt.

4

Ergebnisse

4.1 Phänotypische Analyse von $SLy1^{KO}$ und $SLy1^{KO}p53^{KO}$ NK-Zellen

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) spielen für die uneingeschränkte Funktionstüchtigkeit des Immunsystems eine entscheidende Rolle. Um einen suffizienten Schutz des Organismus vor Neoplasien und Virusinfektionen bieten zu können, ist eine ausreichende Anzahl lebender, aktivierbarer NK-Zellen unabdingbar, die zudem zur zytotoxischen Lyse von Zielzellen fähig sein müssen. Um die Rolle von $SLy1$ in der Entwicklung und Funktion von NK-Zellen zu analysieren, wurden $SLy1^{KO}$ NK-Zellen im Vergleich zu $SLy1^{WT}$ NK-Zellen untersucht. Dabei wurde insbesondere die Auswirkung eines $SLy1$ -Knockouts auf die Anzahl, Lebensfähigkeit, Aktivierbarkeit, Zytotoxizität und Seneszenz der NK-Zellen untersucht.

Das Protein $p53$ stellt einen der wichtigsten Mediatoren von Zellproliferation, Apoptose und Seneszenz dar. Um zu untersuchen, ob die Auswirkungen, die ein $SLy1$ -Knockout auf NK-Zellen hat, über $p53$ ausgelöst werden, erfolgten Versuche mit $SLy1^{KO}p53^{KO}$ NK-Zellen. Über $p53$ medierte Auswirkungen sollten in $SLy1^{KO}p53^{KO}$ NK-Zellen nicht mehr nachweisbar sein.

4.1.1 NK-Zellzahl in $SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO}$ Mäusen

In vorherigen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass sich ein Global-Knockout von $SLy1$ negativ auf die Anzahl der NK-Zellen in der Milz und Lunge auswirkt. In $SLy1^{KO}$ Mäusen war der prozentuale Anteil von NK-Zellen an allen Leukozyten bei normaler Anzahl an NK Vorläuferzellen signifikant verringert (Arefanian et al. 2016). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass diese signifikante Verringerung in der Milz nicht mehr beobachtet wurde, wenn ein NK-Zell-spezifischer Knockout von $p53$ vorliegt (Blumendeller 2022).

NK-Zellzahl in der Lunge

Die Bestimmung der NK-Gesamtzellzahl in der Lunge von SLy1^{KO} und SLy1^{KO}p53^{KO} Mäusen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dabei wurde, wie in Abbildung 5 dargestellt, ein *gate* auf NK-Zellen gesetzt. Die NK-Zellzahl wurde prozentual auf die im FACS bestimmten lebenden Zellen (definiert als FSC > 50K) bezogen und mit der in der Neubauer Zählkammer bestimmten Gesamtzellzahl multipliziert. Beim Auszählen der Zählkammer wurden ebenfalls nur die lebenden Zellen (definiert als Trypanblau-negativ) gezählt. So erhält man näherungsweise die absolute NK-Zellzahl in der Lunge.

$$\frac{\text{NK-Zellen}}{\text{lebende Zellen (FACS)}} [\%] * \text{lebende Zellen (Neubauer)}$$

Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus der Milz (siehe Blumendeller 2022) zeigte sich auch in der Lunge eine signifikante Verringerung der NK-Zellen in SLy1^{KO} Mäusen. In den Lungen von SLy1^{WT} Mäusen fanden sich durchschnittlich $225\,198 \pm 75\,059$ NK-Zellen, bei SLy1^{KO} Mäusen waren es $144\,363 \pm 83\,829$ NK-Zellen. Das entspricht einer signifikanten Reduktion der NK-Zellzahl um 35,9 % durch den SLy1-Knockout. Lag jedoch ein NK-Zell-spezifischer Knockout von p53 vor, war keine signifikante Verringerung zu beobachten (SLy1^{WT}p53^{KO}: $211\,836 \pm 78\,526$ vs. SLy1^{KO}p53^{KO}: $174\,747 \pm 118\,221$ NK-Zellen). Abbildung 11 zeigt eine graphische Darstellung der absoluten NK-Zellzahl in der Lunge von Mäusen der untersuchten Genotypen.

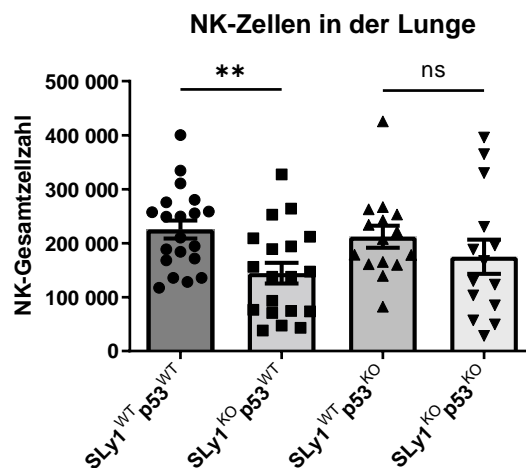


Abbildung 11. Anzahl der NK-Zellen in der Lunge

Die Abbildung zeigt die absolute NK-Zellzahl in der Lunge von Mäusen der angegebenen Genotypen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, SLy1^{WT}p53^{WT}: n=20, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=19, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=16, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=14 (**: p < 0,01, ns = nicht signifikant; Student's t-test).

Um eine bessere Vergleichbarkeit mit publizierten Daten zu ermöglichen, wurde der Anteil pulmonaler NK-Zellen außerdem prozentual von allen CD45⁺ Leukozyten in der Lunge bestimmt. Der Anteil betrug in SLy1^{WT}p53^{WT} Mäusen $7,2 \pm 1,9\%$, in SLy1^{KO}p53^{WT}

Mäusen $4,5 \pm 1,5 \%$, in SLy1^{WT}p53^{KO} Mäusen $6,9 \pm 1,7 \%$ und in SLy1^{KO}p53^{KO} Mäusen $3,7 \pm 1,3 \%$ (n=14-20). Eine graphische Darstellung des Anteils pulmonaler NK-Zellen, prozentual von allen Leukozyten, ist im Anhang in Abbildung 38 auf Seite 110 zu sehen.

NK-Zellzahl in der Milz

Die Milzen aus SLy1^{KO} Mäusen erschienen makroskopisch deutlich kleiner als die Milzen aus Wildtyp-Mäusen. Um diese Beobachtung zu quantifizieren, erfolgte die Bestimmung der Anzahl der Gesamtsplenozyten mittels Neubauer Zählkammer.

Tatsächlich war die Splenozytenzahl in SLy1^{KO} Mäusen hoch signifikant verringert. So wurden in Wildtyp-Mäusen durchschnittlich 108 ± 51 Mio. Splenozyten gezählt, in SLy1^{KO} nur 57 ± 32 Mio. Splenozyten. Dies entspricht einer Reduktion um $47,2 \%$ durch den SLy1-Knockout. Bei gleichzeitigem NK-Zell-spezifischem Knockout von p53 war kein Unterschied zu beobachten (SLy1^{WT}p53^{KO}: $95,2 \pm 37,1$ Mio. vs. SLy1^{KO}p53^{KO}: $90,3 \pm 59,8$ Mio.) (Abbildung 12A).

Aus den Splenozyten wurden die NK-Zellen mittels *Magnetic activated cell sorting* (MACS) isoliert, welche wiederum händisch gezählt wurden. Auch hier zeigte sich eine hoch signifikant verringerte NK-Zellzahl in SLy1^{KO} Mäusen. Diese war um $76,8 \%$ verringert von $675\,463 \pm 290\,667$ (SLy1^{WT}) auf $319\,167 \pm 156\,709$ (SLy1^{KO}) NK-Zellen (Abbildung 12B).

Bei der Analyse der NK-Zellzahl in der Milz von SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen zeigte sich eine Reduktion um $53,9 \%$ von $774\,524 \pm 315\,588$ (SLy1^{WT}p53^{WT}) auf $357\,182 \pm 250\,715$ NK-Zellen (SLy1^{KO}p53^{WT}). Bei gleichzeitigem Vorliegen eines NK-Zellspezifischen p53^{KO} zeigte sich eine Reduktion um $46,1 \%$ von $509\,917 \pm 183\,788$ auf $274\,643 \pm 213\,600$ NK-Zellen (Abbildung 12C).

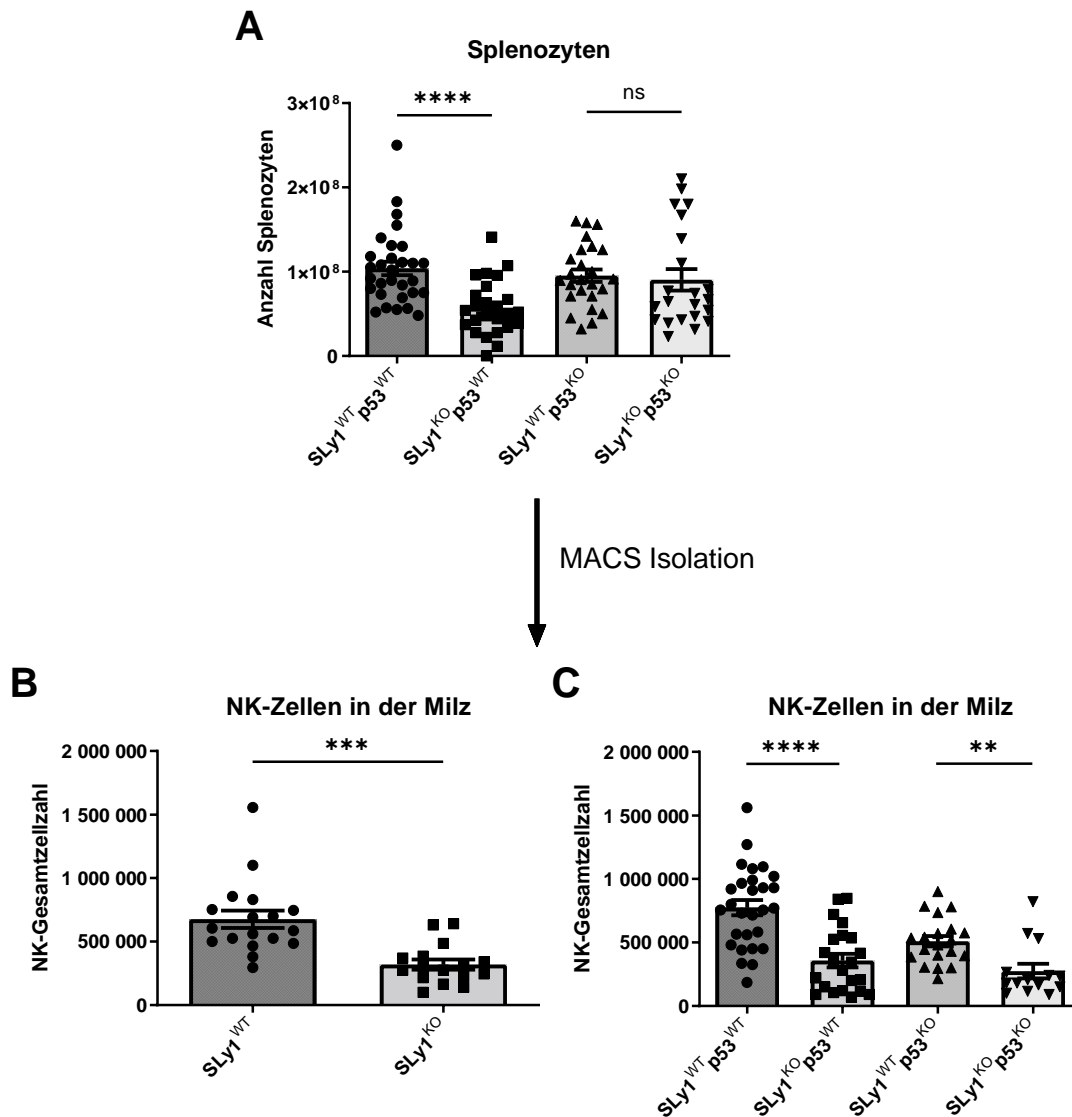


Abbildung 12. Anzahl der Splenozyten und der Milz-NK-Zellen nach MACS Isolation

(A) Dargestellt ist die Splenozytenzahl in SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen. Die Quantifizierung erfolgte durch Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer. SLy1^{WT}p53^{WT}: n=31, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=25, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=26, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=22. (B) SLy1^{WT/KO} NK-Zellen wurden aus der Milz mittels MACS isoliert und die Anzahl anschließend durch Zählen der Zellen in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. SLy1^{WT}: n=19, SLy1^{KO}: n=17. (C) Dargestellt ist die NK-Zellzahl in SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen. SLy1^{WT}p53^{WT}: n=28, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=22, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=20, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=14. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$, ns = nicht signifikant; Student's t-test).

4.1.2 Apoptose von SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen

Apoptose von pulmonalen NK-Zellen

Eine mögliche Ursache, die zu der oben beschriebenen verringerten NK-Zellzahl in der Milz und Lunge von SLy1^{KO} Mäusen führen könnte, wäre eine erhöhte Apoptoserate von SLy1^{KO} NK-Zellen. In SLy1-defizienten CD44⁻CD25⁺ Thymozyten konnte durch unsere Arbeitsgruppe bereits eine erhöhte Induktion von Apoptose gezeigt werden (Reis et al. 2009).

Im Folgenden wurden die pulmonalen NK-Zellen zunächst bezüglich ihrer Größe und Granularität analysiert. Geht eine Zelle in Apoptose, kommt es zunächst zur Zellschrumpfung sowie zur Kondensation und Degradierung ihrer DNA. Die kleinere Zellgröße würde zu einer Abnahme des FSC und die verstärkte Granulierung zu einer Zunahme des SSC führen (van der Meer et al. 2009). Die anschließende Fragmentierung der Zelle in kleine membranumhüllte Apoptoskörperchen würde zu einer Abnahme von FSC und SSC führen (Darzynkiewicz et al. 2001). Frisch isolierte pulmonale SLy1^{KO}p53^{WT} und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen zeigten einen hochsignifikant höheren FSC und SSC als SLy1^{WT}p53^{WT} bzw. SLy1^{WT}p53^{KO} NK-Zellen (siehe Abbildung 13).

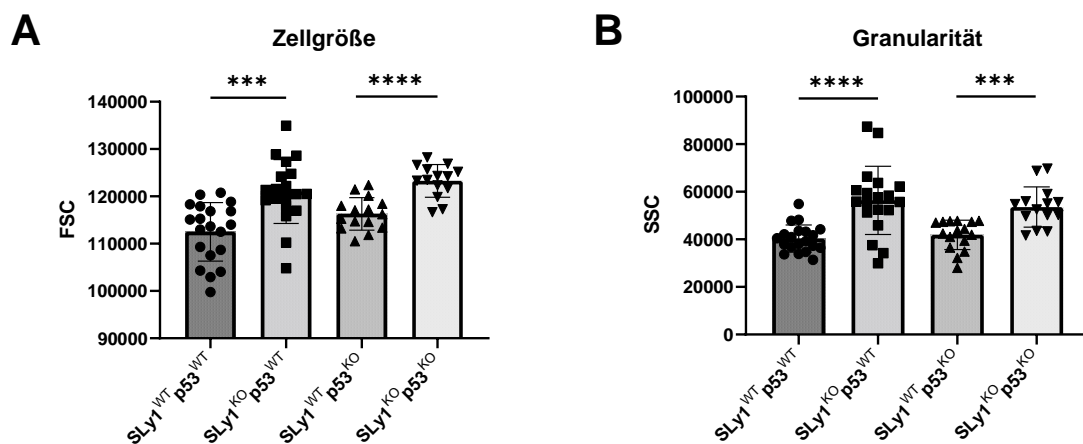


Abbildung 13. Quantifizierung der Zellgröße und Granularität pulmonaler NK-Zellen

Die Abbildungen zeigen die Zellgröße und Granularität von NK-Zellen aus den Lungen von 20 Wochen alten Mäusen der angegebenen Genotypen. (A) Die Zellgröße wurde quantifiziert über den FSC. (B) Die Granularität wurde quantifiziert über den SSC. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, SLy1^{WT}p53^{WT}: n=19, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=18, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=16, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=14 (***: p < 0,001, ****: p < 0,0001; Student's t-test).

Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolge über eine Annexin V/7-AAD Färbung. Apoptose wurde definiert als Annexin V⁺ und weiter unterteilt in frühe und späte Apoptose, wie in Abbildung 5 auf Seite 30 dargestellt. Der Anteil apoptotischer NK-Zellen in der

4. Ergebnisse

Lunge betrug im Mittel $14,9 \pm 5,2 \%$ und zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen (Abbildung 14A). Dabei befanden sich durchschnittlich $9,2 \pm 3,1 \%$ der NK-Zellen in einer früh apoptotischen Phase und $5,7 \pm 3,8 \%$ in einer spät apoptotischen Phase. Auch bei näherer Betrachtung von spät und früh apoptotischen NK-Zellen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen (Abbildung 14B, C).

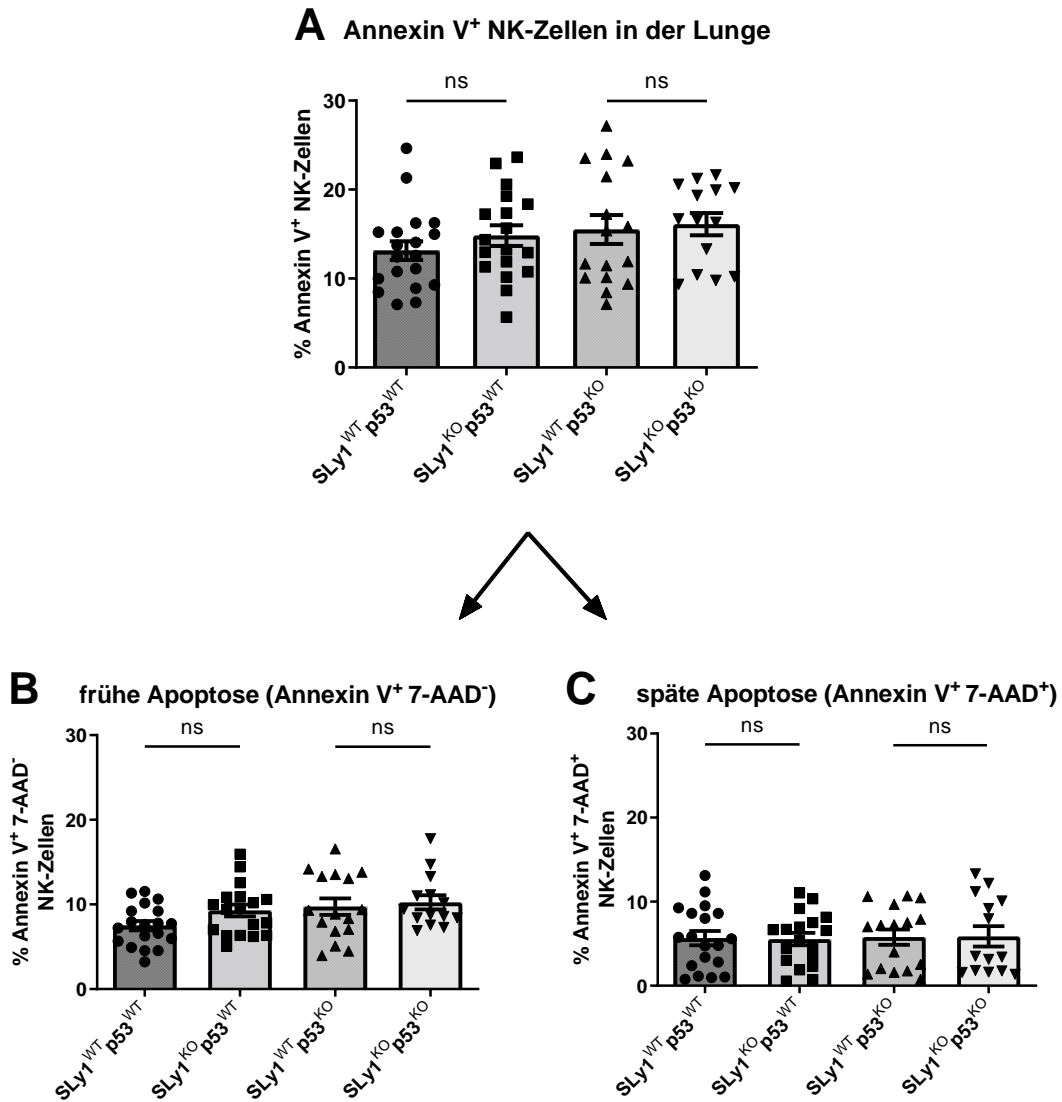


Abbildung 14. Anteil apoptotischer NK-Zellen in der Lunge

Die Abbildungen zeigen die Anteile apoptotischer NK-Zellen in den Lungen von Mäusen der angegebenen Genotypen. (A) Apoptotische NK-Zellen wurden definiert als $CD45.2^+ CD3e^- CD49b^+ Annexin V^+$. (B) Frühe Apoptose wurde definiert als $Annexin V^+ 7-AAD^-$. (C) Späte Apoptose wurde definiert als $Annexin V^+ 7-AAD^+$. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, $SLy1^{WT}p53^{WT}$: $n=19$, $SLy1^{KO}p53^{WT}$: $n=18$, $SLy1^{WT}p53^{KO}$: $n=16$, $SLy1^{KO}p53^{KO}$: $n=14$ (ns = nicht signifikant; Student's t-test).

4.1.3 *In vitro* Überleben von SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen

Die Tendenz von Zellen, leichter bzw. schneller in Apoptose zu gehen, lässt sich auch durch Untersuchung der Überlebensfähigkeit in Kultur beurteilen. Die Isolation der Zellen und die Anpassung an eine veränderte Umgebung stellen Stressfaktoren für primäre Zellen dar (Ben-Porath und Weinberg 2004). Gesunde Wildtyp-Zellen besitzen ein intaktes Signaltransduktions- und Stoffwechselsystem und können sich daher leichter an die Kulturbedingungen adaptieren. Zur Beurteilung der Überlebensfähigkeit von Milz-NK-Zellen wurde der Anteil der lebenden (7-AAD⁻) NK-Zellen nach 4 h in Kulturmedium mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei zeigte sich, dass SLy1^{KO} NK-Zellen eine signifikant schlechtere Überlebensfähigkeit zeigten als SLy1^{WT} NK-Zellen (Abbildung 15). Nach der Inkubationszeit lebten $96,9 \pm 1,9$ % der SLy1^{WT}p53^{WT} NK-Zellen jedoch nur $93,0 \pm 4,0$ % SLy1^{KO}p53^{WT} NK-Zellen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen SLy1^{WT}p53^{KO} NK-Zellen ($95,7 \pm 2,7$ %) und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen ($93,7 \pm 3,1$ %).

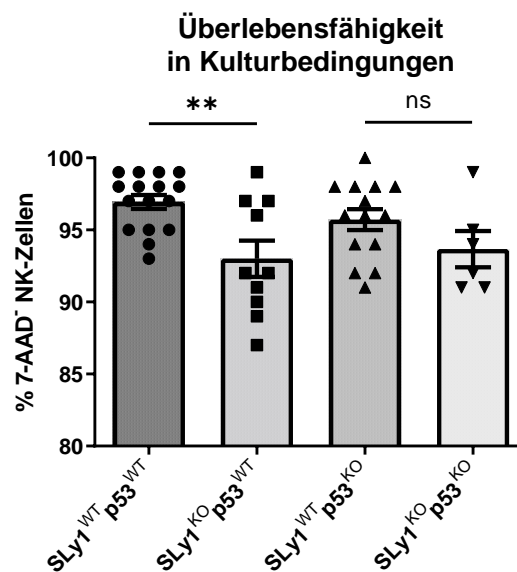


Abbildung 15. Anteil lebender NK-Zellen nach 4 h in Kulturmedium

NK-Zellen der verschiedenen Genotypen wurden für 4 h in supplementiertem DMEM inkubiert und anschließend der Anteil der lebenden NK-Zellen bestimmt. Lebende NK-Zellen wurden definiert als CD45.2⁺CD3e⁻CD49b⁺ 7-AAD⁻. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, SLy1^{WT}p53^{WT}: n=16, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=10, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=14, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=6 (**: p < 0,01, ns = nicht signifikant; Student's t-test).

4.1.4 Expression von Oberflächenrezeptoren

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von Rezeptoren. Diese können in aktivierende und inhibierende Rezeptoren unterteilt werden. Die Aktivierung einer NK-Zelle kann nur erfolgen, wenn die NK-Zelle mehr Signale von aktivierenden Rezeptoren erhält als von inhibierenden Rezeptoren.

Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen

Auf pulmonalen NK-Zellen aus SLy1^{KO} Mäusen und SLy1^{KO}p53^{KO} Mäusen wurde die Expression von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-typischen Oberflächenrezeptoren analysiert. Die Untersuchung erfolgte durchflusszytometrisch. Dabei wurden die aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKp46, NK1.1 und Ly49H untersucht sowie das Oberflächenprotein Sca-1, das als Aktivierungsmarker gilt (Fogel et al. 2013). Des Weiteren erfolgte die Untersuchung der inhibierenden Rezeptoren Ly49A, CD94/NKG2A sowie von KLRG1. Der Rezeptor KLRG1 wird auf reifen, ausdifferenzierten (Huntington et al. 2007), „erschöpften“ (Alvarez et al. 2019) und seneszenten (Melis et al. 2013) Zellen exprimiert und deshalb im Folgenden gemeinsam mit den inhibierenden Rezeptoren aufgeführt. Die Analyse der inhibierenden Rezeptoren sowie von Ly49H erfolgte mit SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen. Die Analyse von NKG2D, NKp46, NK1.1 und Sca-1 wurde aufgrund geringer Expression bzw. eingeschränkter Aussagekraft nur mit SLy1^{WT/KO} NK-Zellen durchgeführt. Die Expression von CD69, einem frühen Aktivierungsmarker sowie Marker für gewebständige Lymphozyten wurde nur auf 2,54 % (n = 2, Daten nicht gezeigt) der NK-Zellen beobachtet und deshalb nicht weiterverfolgt.

In einem Vorversuch wurde evaluiert, ob sich die Durchführung einer Erythrozytenlyse negativ auf den Anteil der lebenden (Annexin V⁻ 7-AAD⁻) Zellen auswirkt. Dafür wurden in zwei unabhängigen Experimenten die Lungen entweder vor der Entnahme mit PBS perfundiert oder nach Dissoziation des Lungengewebes eine Erythrozytenlyse durchgeführt. In den perfundierten Lungen (keine Erythrozytenlyse) war der Anteil der lebenden Zellen zwar im Mittel um 7,1 % höher, streute aber deutlich stärker. Auf eine Perfusion der Lungen wurde deshalb im Folgenden verzichtet.

An den Versuchstagen wurden die Lungen, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, mittels GentleMACS Dissociator aufbereitet und die durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenrezeptoren (Kap. 3.3.6) durchgeführt. Hierfür wurden Antikörper gegen die oben genannten Rezeptoren als PE-Konjugate verwendet. Die Quantifizierung der Rezeptorexpression erfolgte einerseits über den prozentualen Anteil der PE⁺ NK-Zellen von allen

NK-Zellen (*frequency of parent*) und andererseits über die *mean fluorescence intensity* (MFI) der PE⁺ Population. Der *frequency of parent* Wert steht für den Anteil der NK-Zellen, die den jeweiligen Rezeptor exprimieren. Die MFI der PE⁺ Population beschreibt, wie stark die Expression des jeweiligen Rezeptors auf den Zellen ist. Tabelle 14 auf Seite 55 zeigt eine Übersicht über alle Werte sowie Angaben zu den Stichprobengrößen. Da es sich bei den durchflusszytometrischen Daten um relative Werte handelt, wurde die Population der PE⁻ NK-Zellen als Referenzpopulation verwendet. Die MFI Werte der PE⁻ Population finden sich im Anhang (Abbildung 39 - 40, Seite 111 - 112).

Aktivierende Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen

Durch unsere Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass SLy1^{KO} NK-Zellen aus der Milz eine verringerte Expression der aktivierenden Rezeptoren NKG2D, NKp46 und NK1.1 aufweisen (Arefanian et al. 2016).

Auf pulmonalen NK-Zellen zeigte **NKG2D** keine Unterschiede in der *frequency of parent*, die MFI von NKG2D war jedoch auf SLy1^{KO} NK-Zellen tendenziell leicht erhöht. Der Rezeptor **NKp46** zeigte keine unterschiedliche Expression zwischen SLy1^{WT} und SLy1^{KO} NK-Zellen. Der Anteil der **NK1.1**-exprimierenden NK-Zellen war deutlich, jedoch nicht signifikant, verringert ($4,9 \pm 3,2\%$ (SLy1^{KO}) vs. $8,6 \pm 6,9\%$ (SLy1^{WT})). Die MFI zeigte keine Unterschiede. In Abbildung 16A ist der Anteil positiver NK-Zellen (*frequency of parent*) und in Abbildung 16B die MFI für die Rezeptoren NKG2D, NKp46 und NK1.1 zu sehen. Eine Auflistung der zugehörigen Werte findet sich in Tabelle 14.

Der prozentuale Anteil der **Sca-1**-exprimierenden NK-Zellen in der Lunge von SLy1^{KO} Mäusen war signifikant erhöht im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. $23,0 \pm 5,6\%$ der SLy1^{KO} NK-Zellen und $16,5 \pm 5,4\%$ der SLy1^{WT} NK-Zellen waren positiv für Sca-1. Die MFI nach Inkubation mit dem Sca-1 PE Antikörper zeigte keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und SLy1^{KO} NK-Zellen. Eine graphische Darstellung der Expression von Sca-1 ist in Abbildung 16C zu sehen, eine Auflistung der Werte in Tabelle 14.

Der Anteil der **Ly49H**⁺ SLy1^{KO}p53^{WT} NK-Zellen war tendenziell leicht erhöht mit $23,3 \pm 5,2\%$ (SLy1^{KO}p53^{WT}) vs. $19,9 \pm 7,0\%$ (SLy1^{WT}p53^{WT}). Zwischen SLy1^{KO}p53^{KO} und SLy1^{WT}p53^{KO} zeigten sich keine Unterschiede. Die MFI war nach der Inkubation mit dem Ly49H Antikörper bei SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen tendenziell erhöht. Zwischen SLy1^{KO}p53^{WT} und SLy1^{WT}p53^{WT} zeigte die MFI keine unterschiedliche Expression. Eine graphische Darstellung der Expression von Ly49H ist in Abbildung 16D zu sehen, eine Auflistung der Werte findet sich in Tabelle 14.

In Abbildung 14E und F sind repräsentative Punktdiagramme bzw. Histogramme der untersuchten NK-Zellpopulationen für die jeweiligen Rezeptoren gezeigt.

4. Ergebnisse

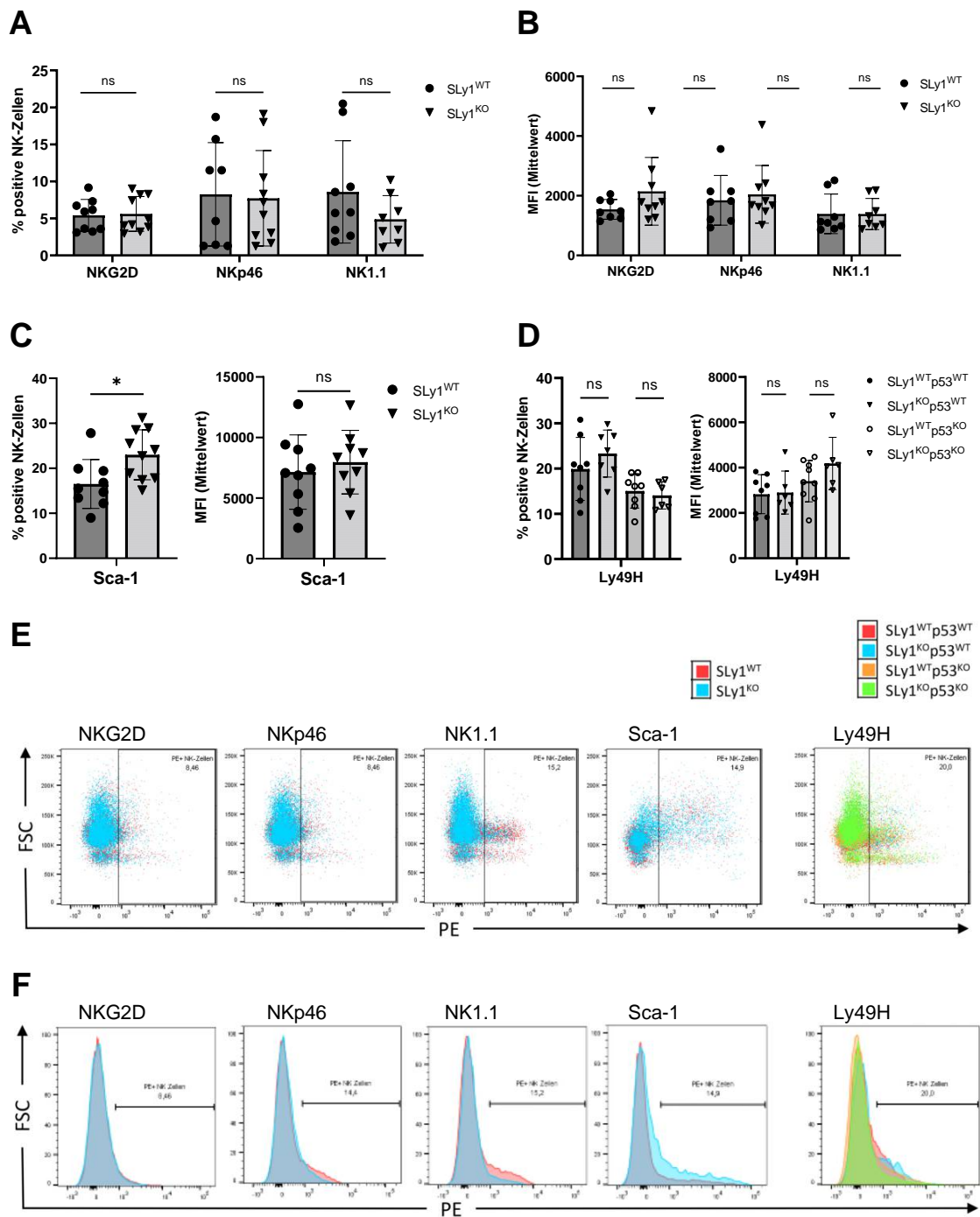


Abbildung 16. Expression aktivierender Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen
 Dargestellt ist (A) der prozentuale Anteil der NK-Zellen, die den jeweiligen Oberflächenrezeptor exprimieren bzw. (B) die *Mean fluorescence intensity* (MFI) der PE⁺ NK-Zellen für die Rezeptoren NKG2D, NKp46 und NK1.1. (C) Prozentualer Anteil und MFI der Expression von Sca-1 auf pulmonalen SLy1^{WT/KO} NK-Zellen. (D) Prozentualer Anteil und MFI der Expression von Ly49H auf pulmonalen SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD (*: p < 0,1, ns = nicht signifikant; Student's t-test). (E) und (F) Repräsentative Punktdiagramme bzw. Histogramme der NK-Zellpopulation. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch nachdem ein *gate* auf CD45.2⁺ CD3e⁻ CD49b⁺ NK-Zellen gesetzt wurde.

Inhibierende Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen

Knapp 40 % der NK-Zellen exprimieren den Oberflächenrezeptor **KLRG1**, hier zeigten sich keine Unterschiede zwischen $SLy1^{KO}p53^{WT}$ und $SLy1^{WT}p53^{WT}$ NK-Zellen (Abbildung 17A). Jedoch war die MFI der $KLRG1^+ SLy1^{KO}p53^{WT}$ NK-Zellen signifikant höher. Sie betrug $3077 \pm 616,8$ für $SLy1^{KO}p53^{WT}$ NK-Zellen und $2359 \pm 232,0$ für $SLy1^{WT}p53^{WT}$ NK-Zellen. Die vermehrte Expression von KLRG1 war auch bei gleichzeitig vorliegendem p53-Knockout in $SLy1^{KO}p53^{KO}$ NK-Zellen vorhanden (Abbildung 17B bzw. Tabelle 14).

Der Anteil der **Ly49A**⁺ NK-Zellen war in den Lungen von $SLy1^{KO}$ Mäusen tendenziell erniedrigt (Abbildung 17A). Für Ly49A positiv waren $11,1 \pm 4,3$ % der $SLy1^{KO}p53^{WT}$ und $13,3 \pm 2,1$ % der $SLy1^{WT}p53^{WT}$ NK-Zellen (Tabelle 14). Diese Verminderung zeigte sich auch zwischen $SLy1^{KO}p53^{KO}$ und $SLy1^{WT}p53^{KO}$ NK-Zellen. Die MFI zeigte keine Unterschiede zwischen $SLy1^{KO}$ und WT-NK-Zellen (Abbildung 17B bzw. Tabelle 14).

CD94 zeigte keine unterschiedliche Expression zwischen den untersuchten Genotypen (Abbildung 17A und B bzw. Tabelle 14).

Der Anteil der **NKG2A**⁺ NK-Zellen war in den Lungen von $SLy1^{KO}p53^{WT}$ Mäusen tendenziell erniedrigt (Abbildung 17A). Für NKG2A positiv waren $25,5 \pm 9,6$ % der $SLy1^{KO}p53^{WT}$ und $31,9 \pm 12,8$ % der $SLy1^{WT}p53^{WT}$ NK-Zellen (Abbildung 17A bzw. Tabelle 14). Diese Verminderung des Anteils pulmonaler $NKG2A^+$ NK-Zellen war zwischen $SLy1^{KO}p53^{KO}$ Mäusen und $SLy1^{WT}p53^{KO}$ Mäusen nicht vorhanden. Die MFI zeigte keine Unterschiede zwischen $SLy1^{KO}$ und WT-NK-Zellen (Abbildung 17B bzw. Tabelle 14).

In Abbildung 14C und D sind repräsentative Punktdiagramme bzw. Histogramme der untersuchten NK-Zellpopulationen für die jeweiligen Rezeptoren gezeigt.

4. Ergebnisse

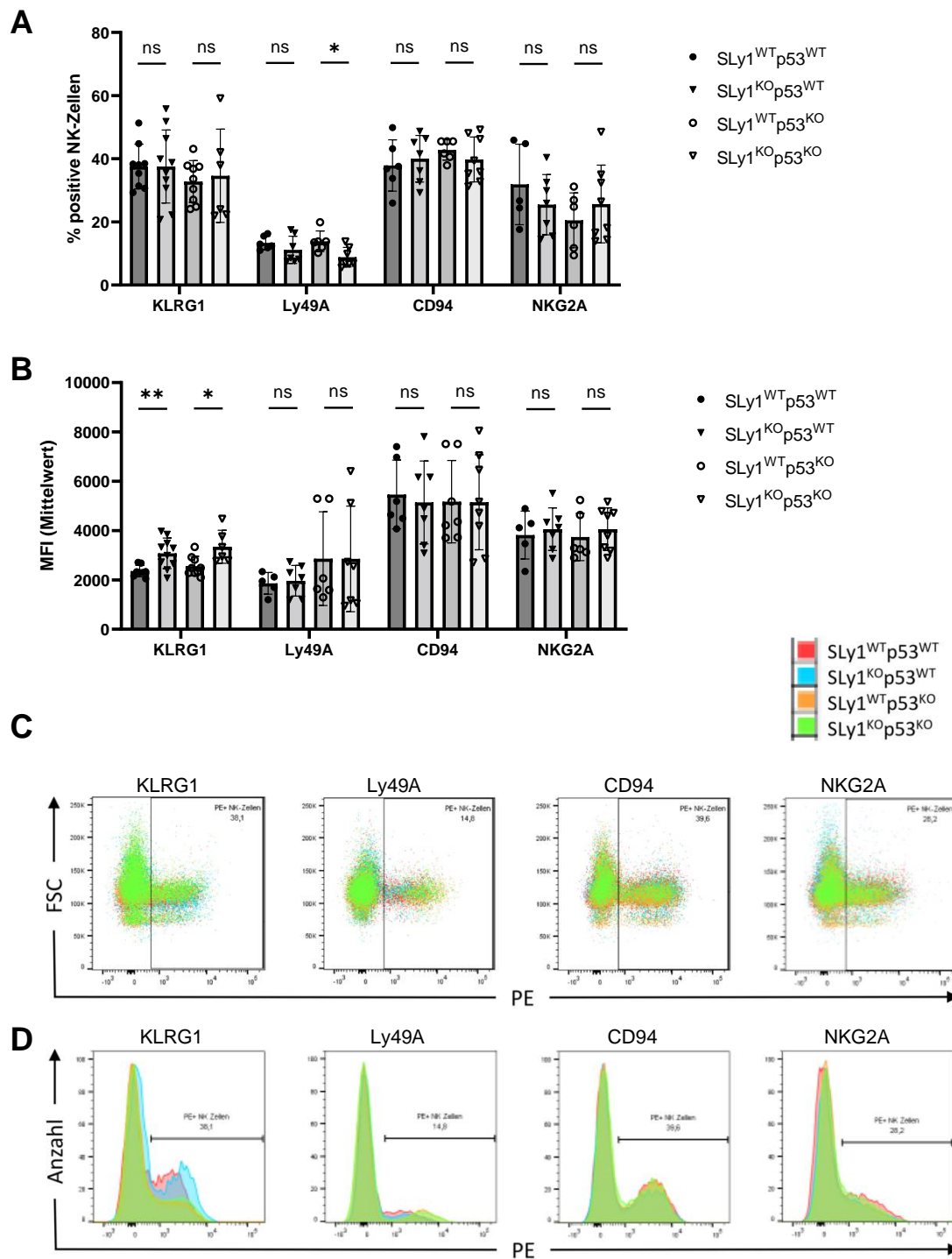


Abbildung 17. Expression inhibierender Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen (A) Prozentualer Anteil der pulmonalen SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen, die den jeweiligen Oberflächenrezeptor exprimieren. (B) MFI der PE⁺ NK-Zellen für die angegebenen Rezeptoren. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (*: $p < 0,1$, **: $p < 0,01$, ns = nicht signifikant; Student's t-test). (C) und (D) Repräsentative Punktdiagramme bzw. Histogramme der NK-Zellpopulation. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch nachdem ein *gate* auf CD45.2⁺ CD3e⁻ CD49b⁺ NK-Zellen gesetzt wurde.

4. Ergebnisse

Tabelle 14. Prozentualer Anteil der PE⁺ pulmonalen NK-Zellen (*frequency of parent*) und der Mean fluorescence intensity (MFI) der PE⁺ NK-Zellen

Oben: Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD des prozentualen Anteils an NK-Zellen, die PE⁺ waren.

Unten: Gezeigt ist der Mittelwert \pm SD der MFI der PE⁺ NK-Zellen.

Prozentualer Anteil der PE ⁺ NK-Zellen								
Genotyp	SLy1 ^{WT}		SLy1 ^{KO}					
NKG2D	n=9	5,4 \pm 2,1 %	n=10	5,6 \pm 2,4 %				
NKp46	n=8	8,3 \pm 7,0 %	n=10	7,7 \pm 6,4 %				
NK1.1	n=9	8,6 \pm 6,9 %	n=9	4,9 \pm 3,2 %				
Sca-1	n=9	16,5 \pm 5,4 %	n=10	23,0 \pm 5,6 %				
Genotyp	SLy1 ^{WT} p53 ^{WT}		SLy1 ^{KO} p53 ^{WT}		SLy1 ^{WT} p53 ^{KO}		SLy1 ^{KO} p53 ^{KO}	
Ly49H	n=8	19,9 \pm 7,0 %	n=7	23,3 \pm 5,2 %	n=9	15,1 \pm 3,8 %	n=6	14,1 \pm 3,0 %
KLRG1	n=9	37,5 \pm 7,1 %	n=10	37,5 \pm 11,6 %	n=9	32,8 \pm 6,6 %	n=6	34,6 \pm 14,8 %
Ly49A	n=6	13,3 \pm 2,1 %	n=7	11,1 \pm 4,3 %	n=6	13,9 \pm 3,3 %	n=7	8,8 \pm 3,1 %
CD94	n=6	37,9 \pm 8,1 %	n=7	40,0 \pm 7,4 %	n=7	42,8 \pm 3,2 %	n=8	39,8 \pm 7,1 %
NKG2A	n=5	31,9 \pm 12,8 %	n=7	25,5 \pm 9,6 %	n=6	20,5 \pm 8,7 %	n=8	25,7 \pm 12,3 %

MFI der PE ⁺ NK-Zellen								
Genotyp	SLy1 ^{WT}		SLy1 ^{KO}					
NKG2D	n=9	1542 \pm 330	n=10	2147 \pm 1135				
NKp46	n=8	1846 \pm 834	n=10	2046 \pm 968				
NK1.1	n=9	1393 \pm 663	n=9	1387 \pm 521				
Sca-1	n=9	7150 \pm 3068	n=10	7969 \pm 2624				
Genotyp	SLy1 ^{WT} p53 ^{WT}		SLy1 ^{KO} p53 ^{WT}		SLy1 ^{WT} p53 ^{KO}		SLy1 ^{KO} p53 ^{KO}	
Ly49H	n=8	2829 \pm 861	n=7	2902 \pm 949	n=9	3404 \pm 912	n=6	4187 \pm 1153
KLRG1	n=9	2359 \pm 232	n=10	3077 \pm 617	n=9	2562 \pm 391	n=6	3344 \pm 670
Ly49A	n=6	1860 \pm 437	n=7	1965 \pm 620	n=6	2862 \pm 1902	n=7	2853 \pm 2143
CD94	n=6	5462 \pm 1392	n=7	5143 \pm 1680	n=7	5172 \pm 1671	n=8	5149 \pm 1928
NKG2A	n=5	3821 \pm 970	n=7	4056 \pm 865	n=6	3738 \pm 957	n=8	4055 \pm 865

4.1.5 Zytotoxizität von SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen

Eine der Hauptaufgaben von NK-Zellen besteht in der Erkennung und Lyse von virusinfizierten oder maligne entarteten Zellen. So wird das Wachstum von *Lewis Lung Carcinoma* (LLC) durch NK-Zellen kontrolliert und ist in SLy1^{KO} Mäusen signifikant höher (Arefanian et al. 2016). Außerdem konnte in vorausgegangenen Studien gezeigt werden, dass SLy1^{KO} NK-Zellen *in vitro* eine weniger effiziente Lyse von LLC-Zellen zeigen als SLy1^{WT} NK-Zellen (Arefanian et al. 2016).

Um zu untersuchen, ob die Verminderung der Zytotoxizität p53-mediert ist, wurden in der vorliegenden Arbeit SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen in einem Zytotoxizitätsassay (Killing Assay) untersucht. Der Zytotoxizitätsassay wurde, wie in Kapitel 3.3.9 beschrieben, durchgeführt. Die Quantifizierung spezifisch lysierter LLC-Zellen erfolgte durchflusszytometrisch. Dafür wurde ein *gate* auf LLC-Zellen gesetzt und der Anteil toter (Annexin V⁺ 7-AAD⁺) LLC-Zellen bestimmt. Davon wurde der Anteil toter LLC-Zellen in einem Kontrollwell ohne NK-Zellen abgezogen. Abbildung 18A zeigt mit Annexin V und 7-AAD gefärbte LLC-Zellen nach Inkubation ohne (links) und mit NK-Zellen (rechts). Die Differenz beider Werte entspricht den LLC-Zellen, die spezifisch durch NK-Zellen lysiert wurden. Abbildung 18B zeigt eine mikroskopische Aufnahme von LLC-Zellen nach vierstündiger Inkubation mit NK-Zellen.

Nach Auswertung der Daten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen LLC-Zellen, die mit SLy1^{WT} NK-Zellen inkubiert wurden und LLC-Zellen, die mit SLy1^{KO} NK-Zellen inkubiert wurden (Abbildung 18C). Der durchschnittliche Anteil spezifisch durch NK-Zellen lysierter LLC-Zellen war mit 8,3 % (SLy1^{WT}) bzw. 10,3 % (SLy1^{KO}) sehr gering. Bei Vorliegen eines NK-Zell-spezifischen p53^{KO} betrug der Anteil lysierter LLC-Zellen 15,9 % (SLy1^{WT}p53^{KO}) bzw. 7,5 % (SLy1^{KO}p53^{KO}).

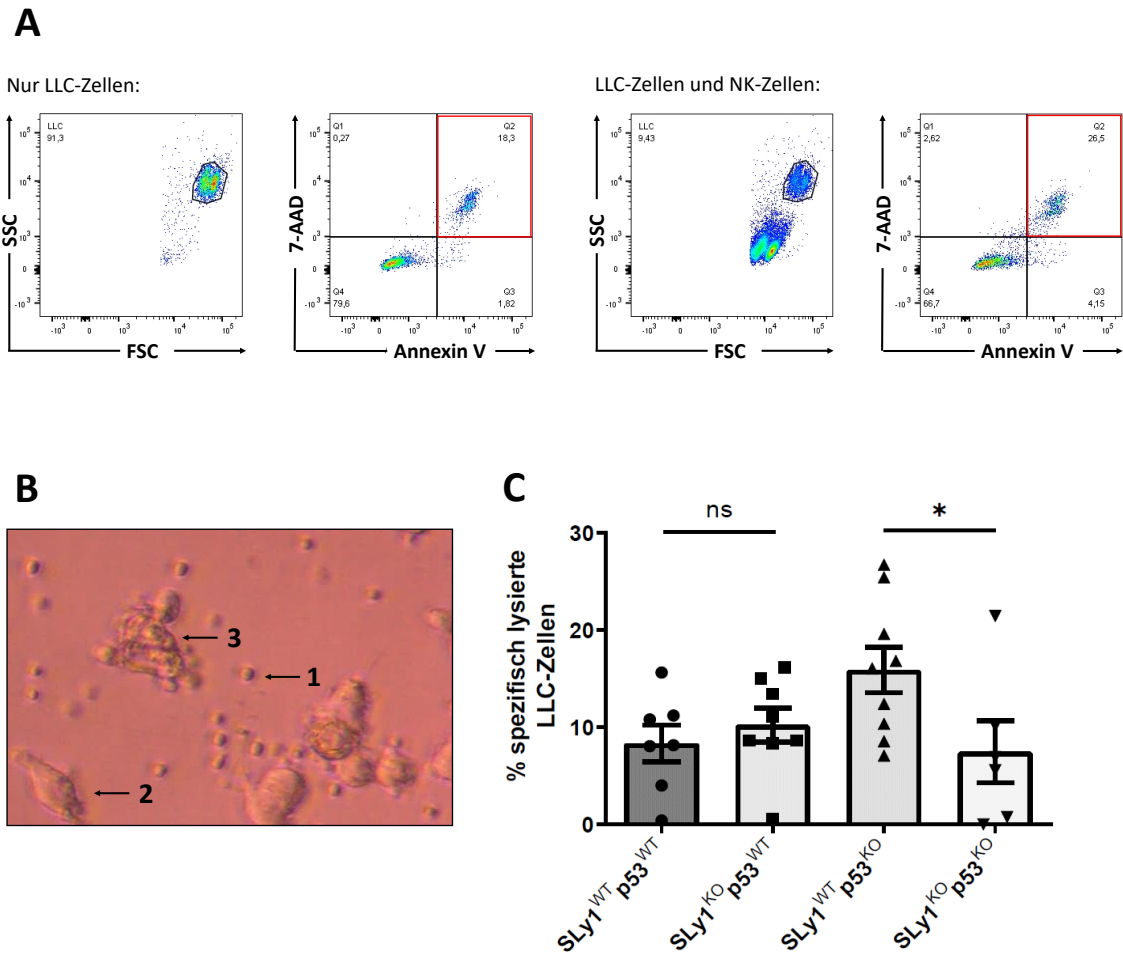


Abbildung 18. *In vitro* Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber LLC-Zellen

NK-Zellen wurden aus der Milz isoliert und mit LLC-Zellen im Verhältnis 1:25 Effektor:Zielzelle inkubiert. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch mittels Annexin V/7-AAD Färbung. (A) Repräsentative Bilder der FACS Daten. Annexin V⁺ 7-AAD⁺ LLC-Zellen wurden als tot definiert (roter Kasten). Proben, in denen sich LLC-Zellen ohne NK-Zellen befanden, dienten als Referenzwert (links). Nach Inkubation mit NK-Zellen war ein größerer Anteil an LLC-Zellen tot als in den Referenzproben (rechts). (B) Frisch isolierte NK-Zellen (1) attackieren und lysieren LLC-Zellen (2) *in vitro* (siehe Pfeil 3). Aufnahme nach vierstündiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂. (C) Die Grafik zeigt den Anteil spezifisch lysierter LLC-Zellen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert ± SD, SLy1^{WT}p53^{WT}: n=7, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=8, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=9, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=6 (*: p < 0,05, ns = nicht signifikant; Student's t-test).

4.1.6 Zelluläre Seneszenz von SLy1^{WT/KO} und SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen

Unter zellulärer Seneszenz versteht man ein Zellstadium, in dem eine Zelle lebt, sich jedoch nicht mehr teilt. Typischerweise treten Zellen am Ende ihres Lebens oder nach Auftreten irreparabler DNA-Schäden in ein seneszenten Stadium ein. Typische Charakteristika von seneszenten Zellen sind eine vergrößerte Zellgröße, veränderte Genexpressionsmuster und eine gesteigerte Aktivität des Enzyms β -Galactosidase (Debacq-Chainiaux et al. 2009). Die β -Galactosidase-Aktivität ist der am häufigsten verwendete Biomarker zur Detektion von seneszenten Zellen.

Die Quantifizierung des Anteils seneszenten NK-Zellen in SLy1^{WT/KO} bzw. SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Durchflusszytometrie und mittels eines β -Galactosidase *tracers*. In der Durchflusszytometrie wurde die gMFI des verwendeten C₁₂FDG Farbstoffes bestimmt. Das β -Galactosidase-Substrat C₁₂FDG wird intrazellulär durch die β -Galactosidase gespalten, wodurch ein fluoreszierender Farbstoff entsteht. Eine starke Fluoreszenz korreliert mit einer hohen β -Galactosidase-Aktivität und somit mit dem Vorliegen von Seneszenz. Abbildung 19 zeigt beispielhaft zwei repräsentative C₁₂FDG Intensitätskurven für NK-Zellen aus der Lunge bzw. der Milz von SLy1^{WT} und SLy1^{KO} Mäusen. Untersucht wurden SLy1^{WT/KO} Mäuse im Alter von 8 Wochen (n=6) und im Alter von 20 Wochen (n=6). Um zu untersuchen, ob die beobachteten Auswirkungen durch p53 vermittelt sind, wurden SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäuse im Alter von 20 Wochen untersucht.

Seneszenz bei pulmonalen NK-Zellen

Zunächst wurde der Effekt eines **SLy1-Knockouts** auf die Seneszenzrate pulmonaler NK-Zellen analysiert. Dafür wurde für jeden Genotyp der Anteil seneszenten NK-Zellen in den Lungen von 8 Wochen bzw. 20 Wochen alten Mäusen bestimmt. In beiden Altersgruppen zeigte sich bei den SLy1^{KO} NK-Zellen eine signifikant höhere Positivität von C₁₂FDG als bei gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. In Abbildung 20A sind die signifikanten Unterschiede mit dem Symbol * bzw. ** markiert). Die C₁₂FDG gMFI lag für SLy1^{KO} NK-Zellen um 19,4 % (8 Wochen alten Mäuse) bzw. 22,9 % (20 Wochen alten Mäuse) höher als für SLy1^{WT} NK-Zellen.

Außerdem wurde, unabhängig vom Genotyp, der Effekt des **Alters** auf die Seneszenzrate analysiert. Dafür wurden NK-Zellen aus alten Mäusen (20 Wochen) mit NK-Zellen aus jungen Mäusen (8 Wochen) verglichen. Pulmonale NK-Zellen aus 20 Wochen alten Mäusen zeigten eine signifikant höhere Aufnahme des Seneszenzmarkers C₁₂FDG, verglichen mit NK-Zellen aus 8 Wochen alten Mäusen. Dies zeigte sich unabhängig vom Genotyp

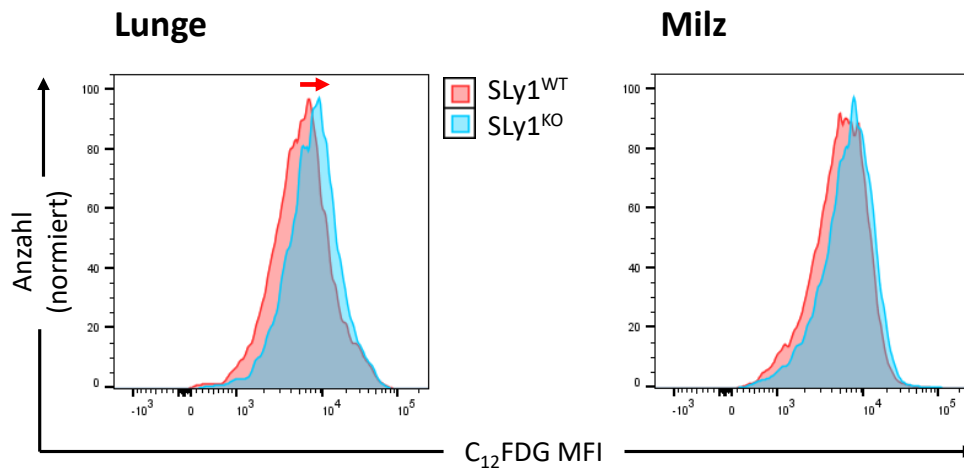


Abbildung 19. Repräsentative C_{12} FDG Histogramme von NK-Zellen aus der Lunge und Milz

NK-Zellen wurden aus der Lunge bzw. Milz von 20 Wochen alten $SLy1^{WT/KO}$ Mäusen isoliert und durchflusszytometrisch analysiert. Es wurde ein *gate* auf $CD45.2^+ CD3e^- CD49b^+$ NK-Zellen gesetzt und die C_{12} FDG MFI als Histogramm dargestellt. $SLy1^{KO}$ NK-Zellen zeigen eine höhere MFI für C_{12} FDG als $SLy1^{WT}$ NK-Zellen.

und ist in Abbildung 20A mit dem Symbol # bzw. ## markiert. Die C_{12} FDG gMFI lag für NK-Zellen aus alten Mäusen durchschnittlich um 17,2 % ($SLy1^{WT}$) bzw. 20,6 % ($SLy1^{KO}$) höher als für NK-Zellen aus jungen. Alle absoluten gMFI Werte sind in Tabelle 15 auf Seite 62 aufgeführt.

Um zu untersuchen, ob die oben beschriebene erhöhte Seneszenzrate bei $SLy1^{KO}$ NK-Zellen intrazellulär über eine p53 Aktivierung ausgelöst wird, wurden die Versuche mit $SLy1^{WT/KO} p53^{WT/KO}$ Mäusen wiederholt. Hier zeigte sich zwischen $SLy1^{KO} p53^{WT}$ und $SLy1^{WT} p53^{WT}$ die gleiche Tendenz: Die Erhöhung der C_{12} FDG gMFI durch einen **SLy1-Knockout** betrug 28,7 %, war jedoch nicht signifikant. Bei gleichzeitigem Vorliegen eines NK-Zell-spezifischen $p53^{KO}$ zeigte sich eine signifikante Erhöhung in $SLy1^{KO}$ Mäusen um 23,3 % (siehe Abbildung 20B). Die absoluten gMFI Werte finden sich ebenfalls in Tabelle 15.

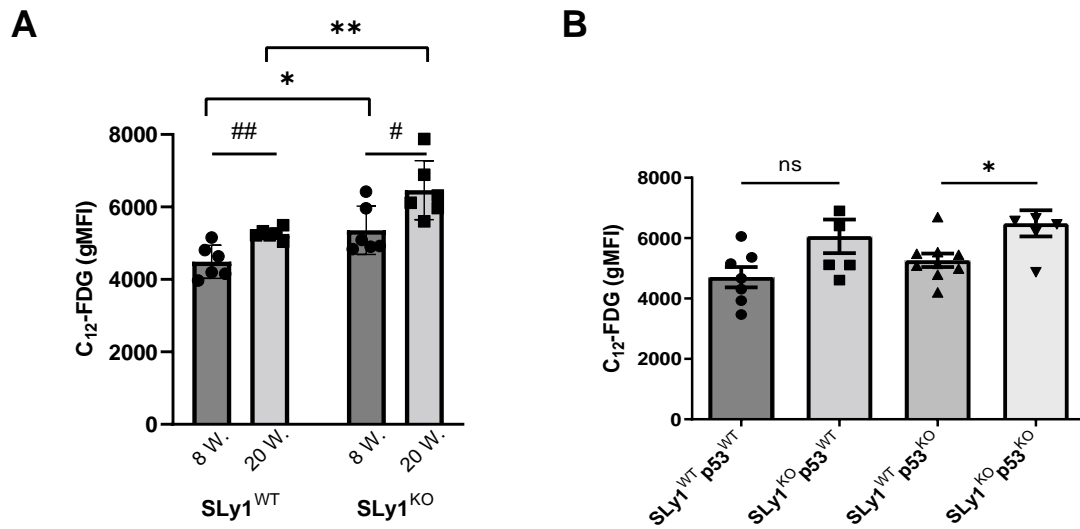


Abbildung 20. Quantifizierung seneszenten NK-Zellen in der Lunge

Die Abbildung zeigt die *geometric mean fluorescence intensity* (gMFI) von pulmonalen NK-Zellen nach Inkubation mit dem β -Galactosidasesubstrat C_{12} FDG. Je höher die gMFI, desto mehr NK-Zellen befinden sich in einem seneszenten Stadium. **(A)** C_{12} FDG Intensität von pulmonalen NK-Zellen. Untersucht wurden jeweils Mäuse im Alter von 8 Wochen und 20 Wochen der angegebenen Genotypen, jeweils n=6. **(B)** C_{12} FDG Intensität von pulmonalen NK-Zellen. Untersucht wurden Mäuse im Alter von 20 Wochen der angegebenen Genotypen, $SLy1^{WT}p53^{WT}$: n=7, $SLy1^{KO}p53^{WT}$: n=7, $SLy1^{WT}p53^{KO}$: n=9, $SLy1^{KO}p53^{KO}$: n=6.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (* bzw. #: $p < 0,1$, ** bzw. ##: $p < 0,01$, ns = nicht signifikant; Student's t-test).

Seneszenz bei Milz-NK-Zellen

Analog zu den Beobachtungen bei pulmonalen NK-Zellen wurde auch für Milz-NK-Zellen zunächst der Effekt eines **SLy1-Knockouts** auf den Anteil seneszenten NK-Zellen analysiert. In beiden Altersgruppen war die C_{12} FDG gMFI von $SLy1^{KO}$ Milz-NK-Zellen höher als bei gleichaltrigen Wildtyp-Mäusen. In der Gruppe der 8 Wochen alten Mäuse zeigte sich durch den SLy1-Knockout eine Erhöhung der C_{12} FDG Intensität um 19,6%. In der Gruppe der 20 Wochen alten Mäuse zeigte sich eine Erhöhung um 23,3%. Beide Erhöhungen waren jedoch aufgrund der Streuung nicht signifikant (siehe Abbildung 21A). Außerdem wurde, unabhängig vom Genotyp, der Effekt des **Alters** analysiert. Auch in der Milz zeigten NK-Zellen aus 20 Wochen alten Mäusen eine höhere β -Galactosidase-Aktivität als NK-Zellen aus 8 Wochen alten Mäusen. Die C_{12} FDG gMFI lag für NK-Zellen aus 20 Wochen alten Mäusen durchschnittlich um 42,7% ($SLy1^{WT}$, nicht signifikant) bzw. 47,0% ($SLy1^{KO}$, signifikant) höher als für NK-Zellen aus jungen Mäusen (siehe Abbildung 21A bzw. Tabelle 15).

Auch hier erfolgte eine Wiederholung der Versuche mit $SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO}$ NK-Zellen aus 20 Wochen alten Mäusen, um zu evaluieren, ob die oben beschriebenen Effekte eines **SLy1-Knockouts** p53-vermittelt sind. Ähnlich wie bei pulmonalen NK-Zellen zeigte sich zwischen $SLy1^{KO}p53^{WT}$ und $SLy1^{WT}p53^{WT}$ eine Erhöhung um 23,7 % (nicht signifikant) der $C_{12}FDG$ gMFI. Bei gleichzeitigem Vorliegen eines NK-Zell-spezifischen $p53^{KO}$ zeigte sich eine signifikant erhöhte $C_{12}FDG$ gMFI in $SLy1^{KO}p53^{KO}$ NK-Zellen um 28,2 % (siehe Abbildung 21B).

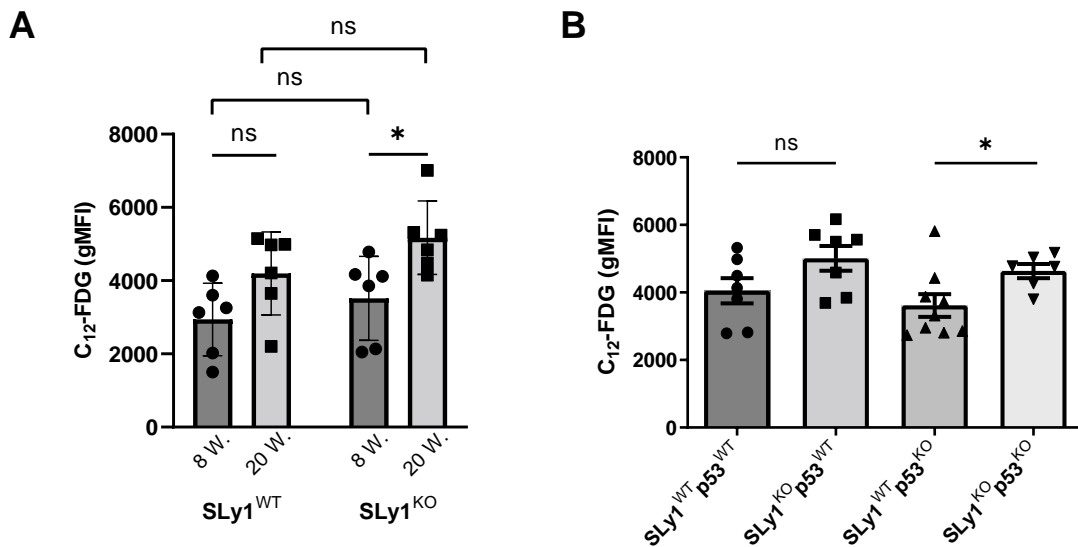


Abbildung 21. Quantifizierung seneszenten NK-Zellen in der Milz

Die Abbildung zeigt die *geometric mean fluorescence intensity* (gMFI) von Milz-NK-Zellen nach Inkubation mit dem β -Galactosidasesubstrat $C_{12}FDG$. Je höher die gMFI, desto mehr NK-Zellen befinden sich in einem seneszenten Stadium. **(A)** $C_{12}FDG$ Intensität von Milz-NK-Zellen. Untersucht wurden jeweils Mäuse im Alter von 8 Wochen und 20 Wochen der angegebenen Genotypen, jeweils n=6. **(B)** $C_{12}FDG$ Intensität von Milz-NK-Zellen. Untersucht wurden Mäuse im Alter von 20 Wochen der angegebenen Genotypen, $SLy1^{WT}p53^{WT}$: n=7, $SLy1^{KO}p53^{WT}$: n=7, $SLy1^{WT}p53^{KO}$: n=9, $SLy1^{KO}p53^{KO}$: n=6.

Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (*: $p < 0,1$, **: $p < 0,01$, ns = nicht signifikant; Student's t-test).

Neben der Analyse der Auswirkung eines $SLy1$ -Knockouts und der des Alters wurde die $C_{12}FDG$ gMFI zwischen den beiden Organen **Lunge und Milz** verglichen. In allen untersuchten Genotypen zeigten pulmonale NK-Zellen eine höhere $C_{12}FDG$ gMFI als Milz-NK-Zellen. Für pulmonale $SLy1^{WT}$ NK-Zellen lag die $C_{12}FDG$ Intensität durchschnittlich um 52,6 % (8 Wochen; Milz gMFI 2941, Lunge gMFI 4488) bzw. 25,4 % (20 Wochen; Milz gMFI 4196, Lunge gMFI 5260) höher als für Milz-NK-Zellen. Für pulmonale $SLy1^{KO}$ NK-Zellen lag die $C_{12}FDG$ Intensität durchschnittlich um 52,3 % (8 Wochen;

4. Ergebnisse

Milz gMFI 3518, Lunge gMFI 5357) bzw. 24,9 % (20 Wochen; Milz gMFI 5172, Lunge gMFI 6462) höher als für Milz-NK-Zellen. Im Anhang findet sich in Abbildung 41 (Seite 113) eine Gegenüberstellung der Werte aus Lunge und Milz.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in SLy1^{KO} Mäusen ein größerer Anteil seneszenten NK-Zellen vorlag als in SLy1^{WT} Mäusen, dass in älteren Mäusen ein größerer Anteil seneszenten NK-Zellen vorlag als in jüngeren Mäusen und dass der Anteil seneszenten NK-Zellen in der Lunge größer war als in der Milz.

Tabelle 15. Übersicht der *geometric mean fluorescence intensity* (gMFI) von NK-Zellen nach Inkubation mit dem β -Galactosidasesubstrat C₁₂FDG

Ergebnisse der durchflusszytometrischen Seneszenzanalyse von NK-Zellen des angegebenen Genotyps. Aufgeführt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung der C₁₂FDG gMFI.

LUNGE	SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{KO}	SLy1 ^{WT} p53 ^{WT}	SLy1 ^{KO} p53 ^{WT}	SLy1 ^{WT} p53 ^{KO}	SLy1 ^{KO} p53 ^{KO}
8 Wochen	4488 \pm 455,6	5357 \pm 669,5				
20 Wochen	5260 \pm 149,5	6462 \pm 812,1	4709 \pm 888,8	6060 \pm 1370	5266 \pm 677,6	6492 \pm 1060

MILZ	SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{KO}	SLy1 ^{WT} p53 ^{WT}	SLy1 ^{KO} p53 ^{WT}	SLy1 ^{WT} p53 ^{KO}	SLy1 ^{KO} p53 ^{KO}
8 Wochen	2941 \pm 990,2	3518 \pm 1146				
20 Wochen	4196 \pm 1131	5173 \pm 1003	4050 \pm 988,9	5009 \pm 969,9	3614 \pm 1006	4634 \pm 516,3

Bestimmung der Seneszenzrate mittels β -Galactosidase *tracer*

Zur Bestätigung der Daten aus der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte die Quantifizierung seneszenten NK-Zellen zusätzlich mittels eines [^{18}F] FPyGal *tracers*, wie in Kapitel 3.3.8 beschrieben. Die im γ -counter gemessene Radioaktivität wurde mittels einer Standardkurve in den prozentualen Anteil der zugegebenen Dosis umgerechnet und auf 1 Mio. Zellen normiert (*% of the injected dose (ID)/10⁶ Zellen*).

In frisch isolierten SLy1^{KO} NK-Zellen zeigte sich eine leicht erhöhte Radioaktivität, verglichen mit SLy1^{WT} NK-Zellen (SLy1^{KO}: $0,20 \pm 0,10$ % ID/10⁶ Zellen; SLy1^{WT}: $0,17 \pm 0,07$ % ID/10⁶ Zellen). Die gemessene Aktivität war in beiden Proben nur geringfügig gegenüber der Hintergrundaktivität erhöht. Abbildung 22 zeigt die Werte für SLy1^{WT} und SLy1^{KO} NK-Zellen.

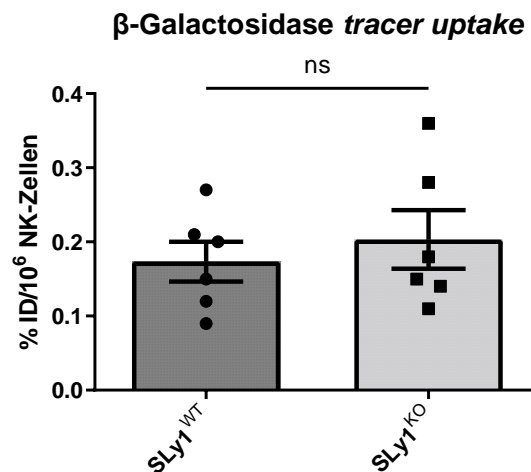


Abbildung 22. Quantifizierung seneszenten NK-Zellen mittels β -Galactosidase *tracer*

SLy1^{WT/KO} NK-Zellen wurden isoliert, mit radioaktiv markiertem Substrat der β -Galactosidase inkubiert und anschließend die Radioaktivität mittels γ -counter quantifiziert. ID = *injected dose*. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, n=6 (ns = nicht signifikant; Student's t-test).

4.2 Proteinbiochemische Analyse von SLy1^{KO} und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen

4.2.1 Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen

Es ist uns gelungen, durch die oben beschriebenen Versuche zu zeigen, dass sich ein SLy1-Knockout erheblich auf den Phänotyp von NK-Zellen auswirkt. Insbesondere führte er zu verringerten NK-Zellzahlen in der Milz und Lunge, erhöhter Expression der Oberflächenrezeptoren Sca-1 und KLRG1 und zu einer erhöhten Seneszenzrate. Im Folgenden sollen nun die Auswirkungen eines SLy1-Knockouts auf Proteinebene analysiert werden. Wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, liegt in SLy1^{KO} NK-Zellen eine erhöhte mRNA Expression der mit dem p53-Signalweg assoziierten Gene Atr, Chk1 sowie Chk2 vor (Blumendeller 2022).

Ein Ziel dieser Arbeit war die Validierung dieser qPCR Daten auf Proteinebene. Es wurde daher untersucht, ob ein Knockout von SLy1 Auswirkungen auf die Expression und Phosphorylierung der Proteine ATM, ATR, Chk1, Chk2, p53 und Mdm2 in NK-Zellen hat. Dies erfolgte an frisch isolierten, unbehandelten SLy1^{WT/KO} NK-Zellen. Die Quantifizierung der Proteinexpression sowie der Phosphorylierung erfolgte mittels klassischem Western Blot. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} NK-Zellen. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Quantifizierung mittels klassischem Western Blot sowie repräsentative Western Blot Aufnahmen.

Der Nachweis der Proteine war im klassischen Western Blot jedoch aufgrund geringer Proteinmenge nur erschwert möglich. Es erfolgte deshalb zusätzlich eine Quantifizierung mittels WES, ein automatisiertes, kapillarbasiertes Immunoblotverfahren der Firma ProteinSimple™, welches eine höhere Sensitivität aufweist. Im WES zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} NK-Zellen. Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse der WES Immunoblots sowie repräsentative *lane view* Aufnahmen. Die Auswertung der WES Immunoblots erfolgte über einen *peak fit* der Fläche unter der Kurve und ist exemplarisch im Anhang in Abbildung 42-43, Seite 114-115 zu sehen. In Abbildung 25 ist das relative Verhältnis der Proteinexpression von SLy1^{KO} NK-Zellen zu SLy1^{WT} NK-Zellen dargestellt, errechnet aus den Daten der Western Blots (Abbildung 25A) bzw. der WES Immunoblots (Abbildung 25B). Eine Übersicht über alle absoluten und relativen Werte findet sich in Tabelle 16 auf Seite 71.

4. Ergebnisse

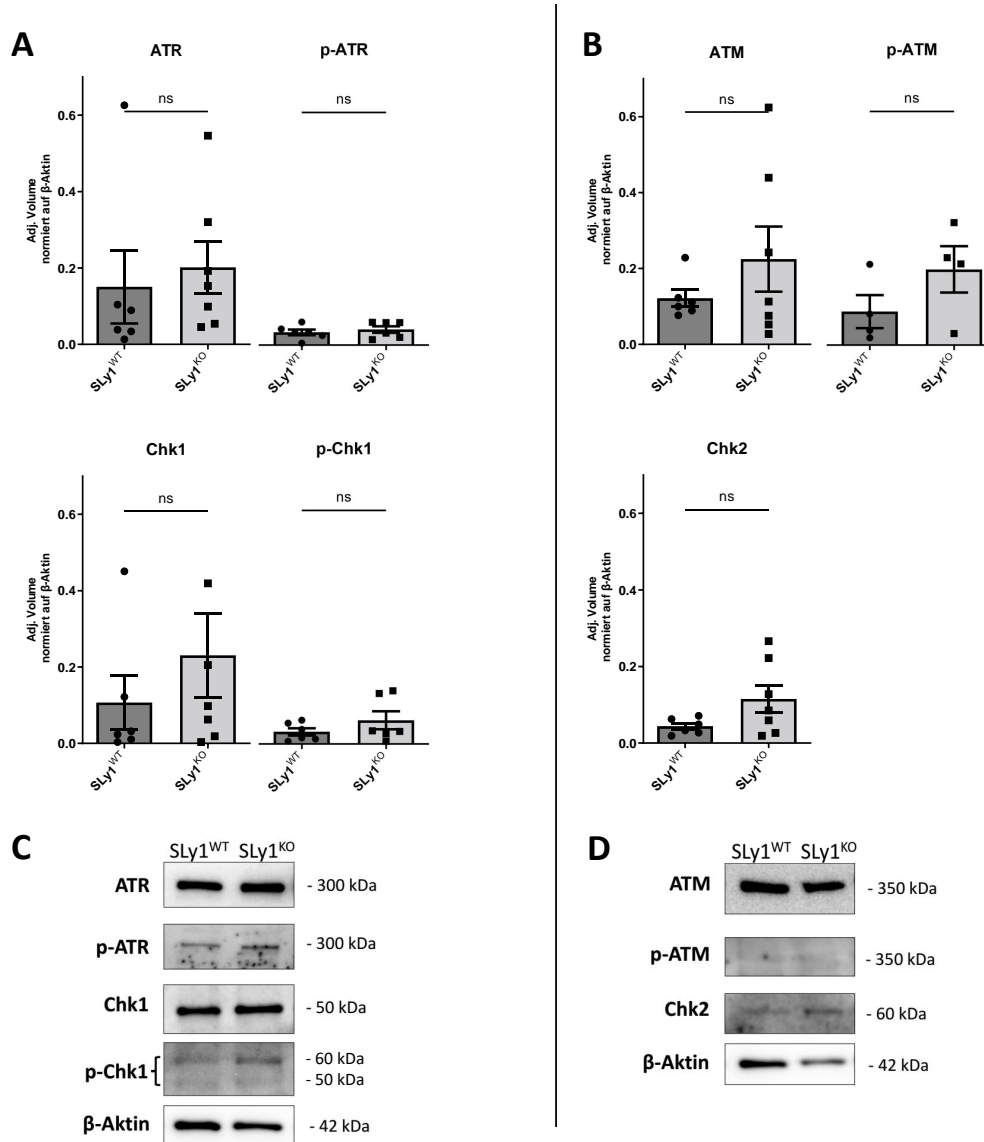


Abbildung 23. Absolute Expression und Phosphorylierung der DNA damage response assoziierten Proteine in NK-Zellen mittels klassischem Western Blot

SLy1^{WT} und SLy1^{KO} NK-Zellen wurden direkt nach der Isolation lysiert und die Proteinexpression mittels klassischem Western Blot quantifiziert.

Quantifizierung der Expression und Phosphorylierung von (A) ATR (oben) und Chk1 (unten) sowie (B) ATM (oben) und Chk2 (unten). β -Aktin diente als Ladekontrolle. Adj. Volume = Volumen der Bande nach Abzug des Hintergrundsignals. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, n=4-7 (ns = nicht signifikant; Student's t-test). (C & D) Repräsentative Western Blots zu A und B.

Expression von ATR/Chk1 und ATM/Chk2

Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, ist ATR das erste Enzym der DDR Kaskade, welches vor allem nach Einzelstrangbrüchen aktiviert wird. Die Expression von ATR war im WES in SLy1^{KO} NK-Zellen leicht erhöht (rel. Expression KO:WT 1,0 (WB) bzw. 1,6 (WES)). Die Expression von p-ATR (Ser428) war ebenfalls in SLy1^{KO} NK-Zellen leicht erhöht (rel. Expression KO:WT 1,4 (WB) bzw. 1,8 (WES)). Aufgrund der oben beschriebenen Erhöhung von ATR und p-ATR in SLy1^{KO} NK-Zellen erfolgte die Quantifizierung der *downstream* Kinase Chk1. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede in der Expression von Chk1 zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} NK-Zellen (rel. Expression KO:WT 0,9 (WB) bzw. 1,0 (WES)). Die Expression von p-Chk1 (Ser317) zeigte im WB ebenfalls keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} NK-Zellen, im WES war sie leicht erniedrigt (rel. Expression KO:WT 1,1 (WB) bzw. 0,7 (WES)) (Abbildung 25).

Die Kinase ATM steht ebenfalls am Beginn der DDR Kaskade, wird jedoch vor allem durch Doppelstrangbrüche aktiviert. Die Expression von ATM zeigte keine Unterschiede zwischen SLy1^{KO} und SLy1^{WT} NK-Zellen (rel. Expression KO:WT 0,9 (WB) bzw. 0,8 (WES)). Die Expression von p-ATM (Ser1981) war in SLy1^{KO} NK-Zellen erhöht (rel. Expression KO:WT 2,5 (WB) bzw. 2,0 (WES)). Aufgrund des in SLy1^{KO} NK-Zellen erhöhten Anteils von p-ATM erfolgte die Quantifizierung von Chk2. Die Expression von Chk2 war in SLy1^{KO} NK-Zellen im Western Blot erhöht, im WES leicht erniedrigt (rel. Expression KO:WT 1,9 (WB) bzw. 0,7 (WES), Abbildung 25). Die Expression von p-Chk2 konnte aufgrund geringer Expression nicht quantifiziert werden (vgl. Abbildung 37 auf Seite 94).

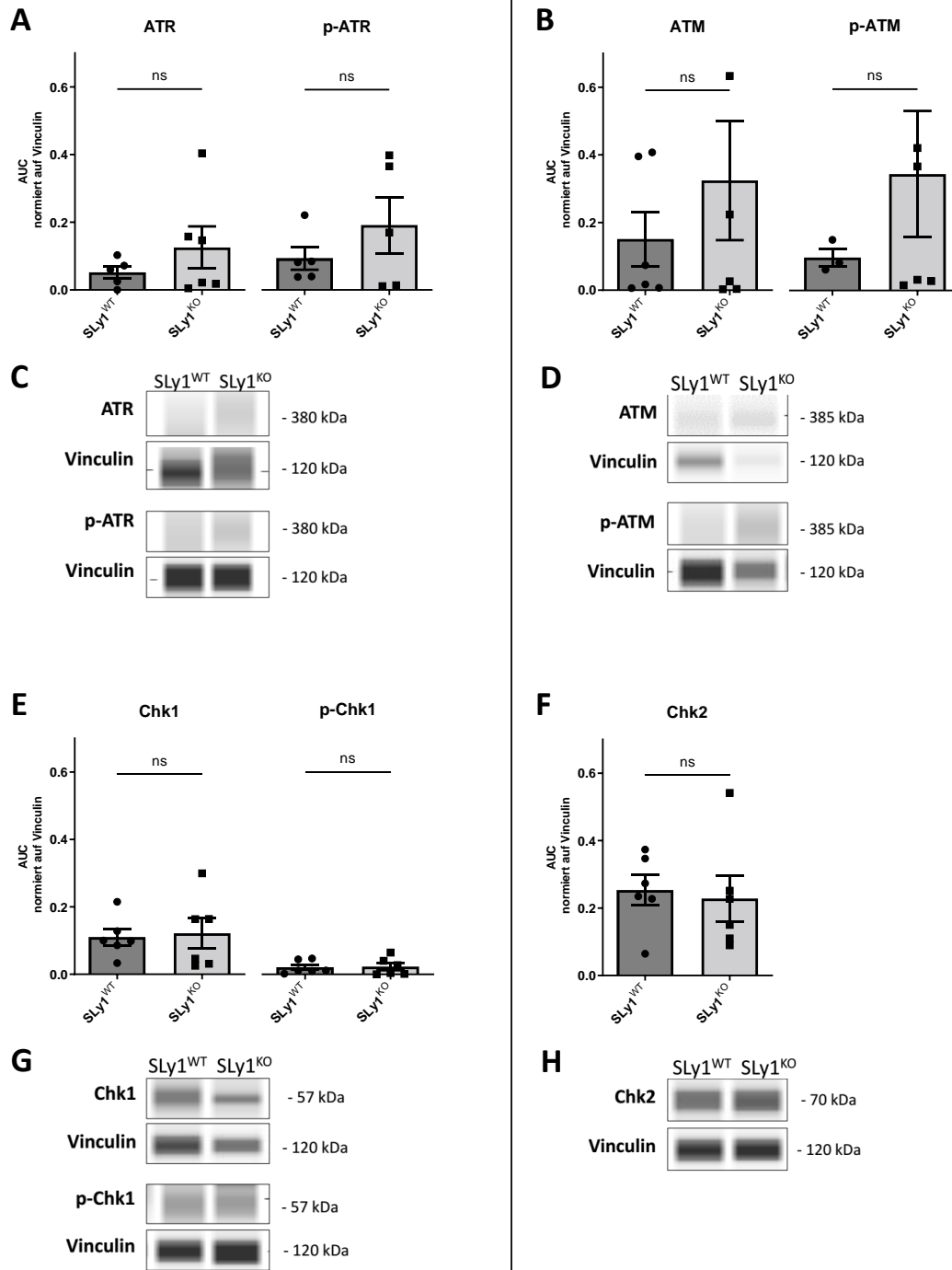


Abbildung 24. Absolute Expression und Phosphorylierung der DNA damage response assoziierten Proteine in NK-Zellen mittels WES - automatisiertem Western Blot

SLy1^{WT} und SLy1^{KO} NK-Zellen wurden direkt nach der Isolation lysiert und die Proteinexpression mittels WES quantifiziert.

Quantifizierung der Expression und Phosphorylierung von (A) ATR, (B) ATM, (E) Chk1 und (F) Chk2. Vinculin diente als Ladekontrolle. AUC = area under the curve. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, n=4-6 (ns = nicht signifikant; Student's t-test). (C, D, G, H) Repräsentative WES lane views zu A, B, E und F.

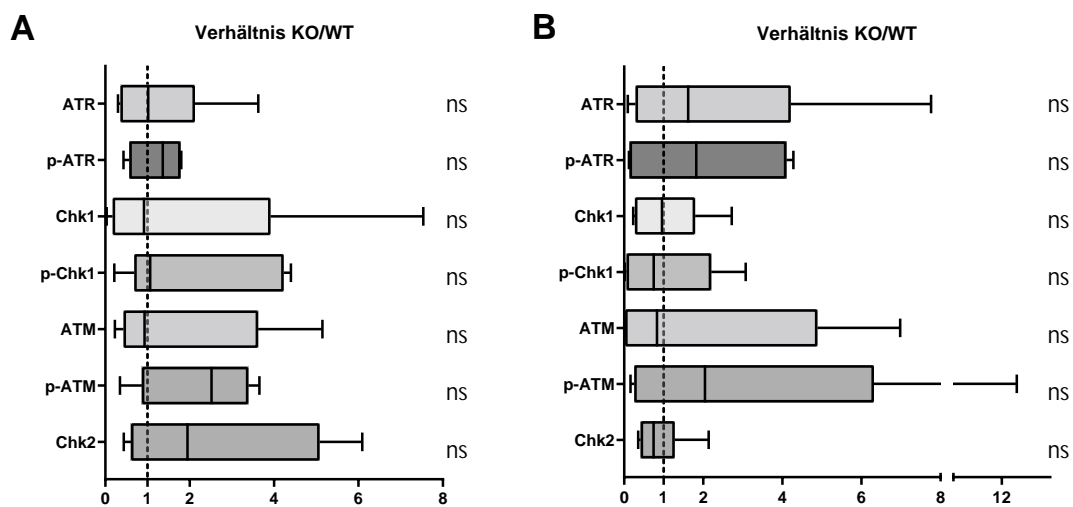


Abbildung 25. Relatives Verhältnis der DDR Proteinexpression von SLy1^{KO} NK-Zellen zu SLy1^{WT} NK-Zellen.

(A) Quantifizierung der Proteinexpression mittels klassischem Western Blot. (B) Quantifizierung der Proteinexpression mittels WES - automatisiertem Western Blot.

Aufgrund geringer Fallzahlen und nicht-normalverteilter Werte erfolgte die Auswertung über den Median. Dargestellt sind der Median, die zwei Quartilen und die beiden Extremwerte als Box-Whisker-Plot (n=4-7; ns = nicht signifikant; Student's t-test).

Expression von p53 und Mdm2

Wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, findet in SLy1^{KO} NK-Zellen eine erhöhte Expression von p53 statt (Arefanian et al. 2016). Bei der Quantifizierung der Proteinexpression mittels WES ließ sich in der vorliegenden Arbeit dieses Ergebnis nicht reproduzieren. Es zeigte sich keine unterschiedliche Expression von p53 zwischen SLy1^{KO}p53^{WT} und SLy1^{WT}p53^{WT} NK-Zellen.

In p53^{fl/fl}Ncr1-Cre^{tg/+} Mäusen wird NK-Zell-spezifisch kein p53 exprimiert. In NK-Zellen aus diesen Mäusen (in Abbildung 26A als SLy1^{WT}p53^{KO} bzw. SLy1^{KO}p53^{KO} bezeichnet) waren allenfalls minimale Mengen von p53 und p-p53 nachweisbar, was den erfolgreichen Knockout belegt. Die Expression von p-p53 (Ser15) war in SLy1^{KO}p53^{WT} NK-Zellen auf 54 % erniedrigt. Abbildung 26A zeigt eine graphische Darstellung der absoluten, mittels WES quantifizierten Expression von p53 und p-p53. Die entsprechenden repräsentativen WES Daten im *lane view* sind in Abbildung 26B zu sehen.

Die Ubiquitin-Ligase Mdm2 ist der wichtigste Regulator von p53, da sie den sofortigen Abbau von p53 herbeiführen kann. Die Expression von Mdm2 war in SLy1^{KO}p53^{WT} NK-Zellen auf 65 % verringert. Diese verringerte Expression war auch bei Vorliegen eines NK-Zell spezifischen p53-Knockouts nachweisbar. Die Expression von p-Mdm2 (Ser166) war in SLy1^{KO}p53^{WT} NK-Zellen auf 170 % erhöht. Bei Vorliegen eines spezifischen p53^{KO} zeigte sich jedoch eine Verringerung auf 17 % in SLy1^{KO}p53^{KO} bezogen auf SLy1^{WT}p53^{KO} NK-Zellen. Abbildung 26C zeigt die graphische Darstellung der absoluten, mittels WES quantifizierten Expression von Mdm2 und p-Mdm2 sowie repräsentative WES Daten im *lane view* (26D). Die absoluten Werte für p53 und Mdm2 sind in Tabelle 17 aufgeführt.

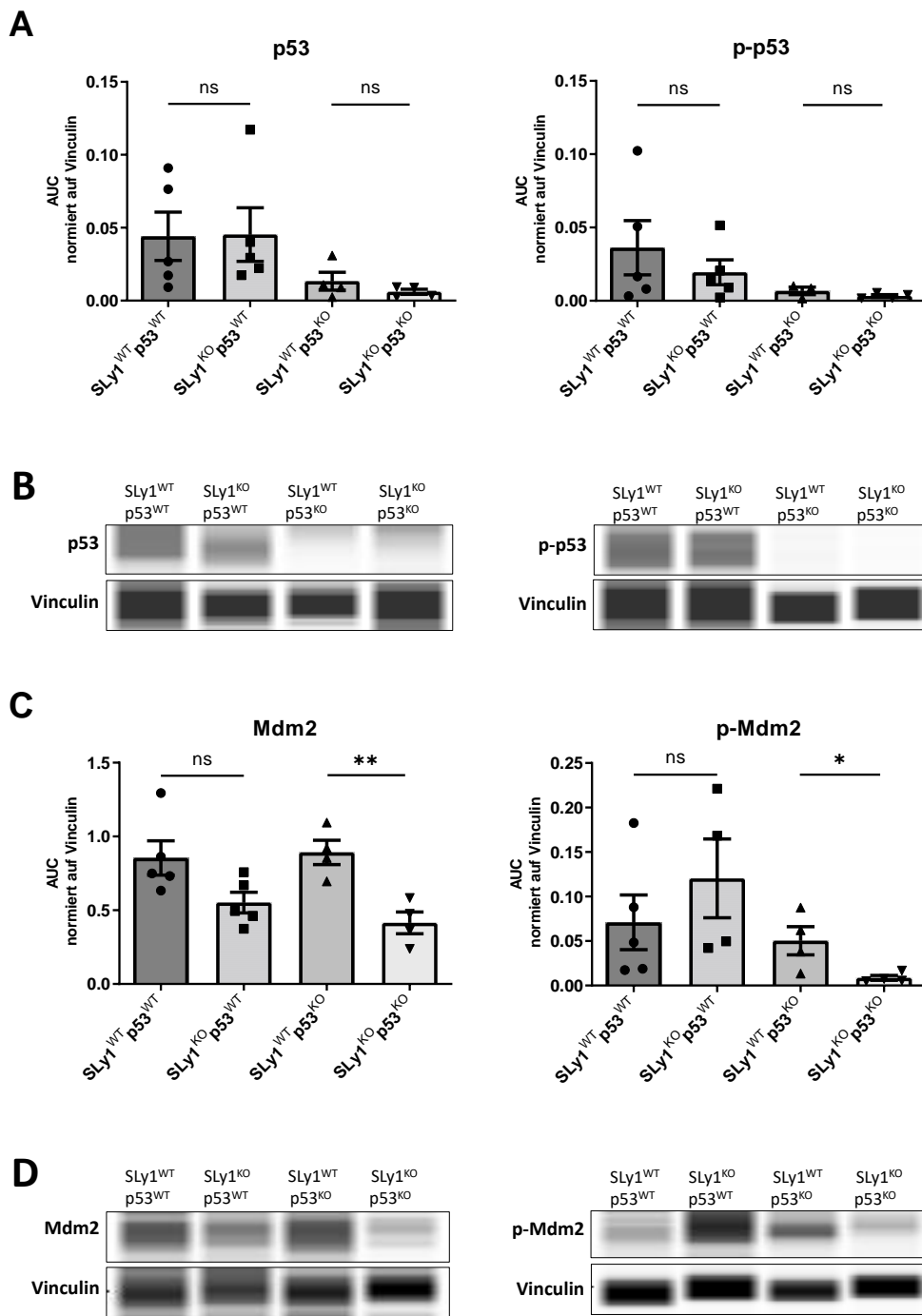


Abbildung 26. Expression und Phosphorylierung von p53 und Mdm2 in NK-Zellen mittels WES - automatisiertem Western Blot

NK-Zellen wurden direkt nach der Isolation lysiert und die Proteinexpression mittels WES quantifiziert. Vinculin diente als Ladekontrolle. (A) und (C) Expression von Gesamt-p53 und phosphoryliertem p53 (p-p53) bzw. Gesamt-Mdm2 und p-Mdm2. AUC = area under the curve. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (*: $p < 0,1$, ns = nicht signifikant; Student's t-test). (B) und (D) Repräsentative WES lane views von p53 und p-p53 bzw. Mdm2 und p-Mdm2.

4. Ergebnisse

Tabelle 16. Expression und Phosphorylierung der DDR Proteine

Die Tabelle zeigt die absoluten, auf β -Aktin bzw. Vinculin normierten Werte der Proteinquantifizierungen sowie das relative Verhältnis der Proteinexpression von $SLy1^{KO}/SLy1^{WT}$ NK-Zellen. Die Quantifizierung erfolgte an frisch isolierten NK-Zellen mittels klassischem Western Blot oder mittels eines automatisierten Immunoblotverfahrens. p- = Phospho-; WB = Western Blot; WES = automatisiertes Immunoblotverfahren

Protein	Verfahren	Anzahl	$SLy1^{WT}$ MW \pm SD	$SLy1^{KO}$ MW \pm SD	$SLy1^{KO}/SLy1^{WT}$ Median
ATR/ β -Aktin	WB	n=7	0,151 \pm 0,236	0,201 \pm 0,179	1,015
ATR/Vinculin	WES	n=6	0,052 \pm 0,040	0,126 \pm 0,152	1,619
p-ATR/ β -Aktin	WB	n=6	0,033 \pm 0,018	0,040 \pm 0,021	1,362
p-ATR/Vinculin	WES	n=5	0,093 \pm 0,075	0,192 \pm 0,185	1,824
Chk1/ β -Aktin	WB	n=7	0,107 \pm 0,174	0,230 \pm 0,292	0,915
Chk1/Vinculin	WES	n=6	0,110 \pm 0,060	0,122 \pm 0,108	0,955
p-Chk1/ β -Aktin	WB	n=6	0,032 \pm 0,023	0,062 \pm 0,058	1,063
p-Chk1/Vinculin	WES	n=6	0,021 \pm 0,019	0,023 \pm 0,026	0,746
ATM/ β -Aktin	WB	n=7	0,121 \pm 0,055	0,225 \pm 0,227	0,930
ATM/Vinculin	WES	n=6	0,151 \pm 0,196	0,324 \pm 0,432	0,828
p-ATM/ β -Aktin	WB	n=4	0,087 \pm 0,086	0,197 \pm 0,121	2,517
p-ATM/Vinculin	WES	n=4	0,097 \pm 0,046	0,343 \pm 0,456	2,043
Chk2/ β -Aktin	WB	n=7	0,044 \pm 0,021	0,115 \pm 0,096	1,948
Chk2/Vinculin	WES	n=6	0,253 \pm 0,110	0,228 \pm 0,166	0,745

Tabelle 17. Expression und Phosphorylierung von p53 und Mdm2 in NK-Zellen

Die Tabelle zeigt die absoluten, auf Vinculin normierten Werte der Proteinquantifizierungen. Die Quantifizierung erfolgte an frisch isolierten NK-Zellen mittels eines automatisierten Western Blotverfahrens (WES). p- = Phospho-; WES = automatisiertes, kapillarbasiertes Immunoblotverfahren, Anz. = Anzahl. Jeweils MW \pm SD.

Protein	Anz.	$SLy1^{WT} p53^{WT}$	$SLy1^{KO} p53^{WT}$	$SLy1^{WT} p53^{KO}$	$SLy1^{KO} p53^{KO}$
p53/Vinculin	n=4-5	0,044 \pm 0,037	0,045 \pm 0,041	0,013 \pm 0,012	0,006 \pm 0,004
p-p53/Vinculin	n=3-5	0,036 \pm 0,041	0,020 \pm 0,019	0,007 \pm 0,004	0,003 \pm 0,002
Mdm2/Vinculin	n=4-5	0,854 \pm 0,259	0,552 \pm 0,158	0,891 \pm 0,165	0,415 \pm 0,148
p-Mdm2/Vinculin	n=4-5	0,071 \pm 0,069	0,120 \pm 0,089	0,050 \pm 0,032	0,009 \pm 0,006

4.2.2 Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in Thymozyten nach induziertem DNA-Schaden

Die in Kapitel 4.2.1 vorgestellten Ergebnisse zur Expression von *DNA damage response* (DDR) Proteinen zeigten keine signifikant veränderte Expression der untersuchten Proteine in SLy1^{KO} NK-Zellen. Zur Evaluation dieser Ergebnisse erfolgte eine Protokolletablierung zur Induktion eines DNA-Schadens vor der Bestimmung der Proteinlevel. Dadurch sollte zum einen eine Positivkontrolle für zukünftige Versuche generiert werden und zum anderen sollte untersucht werden, ob ein SLy1-Knockout die Reparaturfähigkeit der Zelle nach induziertem DNA-Schaden beeinflusst. Als Methode zur DNA-Schädigung wurde die Bestrahlung mit γ -Strahlung gewählt. Die Bestrahlung von Lymphozyten mit γ -Strahlung führt nachweislich zur Phosphorylierung von p53, Aktivierung der DDR Kaskade und zum Zellzyklusarrest oder zur Apoptose (Chao et al. 2003). Aufgrund besserer Verfügbarkeit wurden die Protokolletablierung sowie die Bestrahlungsversuche mit Thymozyten durchgeführt. Die Expression und Phosphorylierung wurde analog zu den oben beschriebenen Versuchen von folgenden, mit DNA-Schaden assoziierten Proteinen bestimmt: ATM, Chk2, ATR, Chk1, p53 und Mdm2.

Zur Validierung des Versuchsaufbaus wurde in einem Vorversuch der Anteil der apoptotischen Zellen 10 h nach Bestrahlung mit 0 Gy, 2 Gy und 5 Gy bestimmt. Dies geschah mittels Durchflusszytometrie. Apoptotische Zellen wurden als Annexin V⁺ 7-AAD⁺ definiert. Wurden die Zellen nicht bestrahlt, betrug der Anteil apoptotischer Zellen nach 10 h durchschnittlich 34,9 %, nach Bestrahlung mit 2 Gy betrug er 36,8 % und nach Bestrahlung mit 5 Gy 46,9 % (Abbildung 27A).

Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigten die meisten der untersuchten Proteine zum Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung die maximale Expression (Abbildung 27B). Die Bestrahlung mit 5 Gy scheint einen starken DNA-Schaden hervorzurufen, der bereits nach einer Stunde zu einer massiv erhöhten Expression der DDR Proteinen führt (Abbildung 27C). Nach 2 h bzw. 4 h zeigte sich diese erhöhte Expression bereits wieder stark rückläufig.

Die Bestrahlungsdosis wurde für zukünftige Versuche auf 2 Gy festgelegt.

Bei der Versuchsdurchführung wurden Thymozyten aus SLy1^{WT/KO} Mäusen isoliert, mit 2 Gy bestrahlt und anschließend bei 37°C, 5 % CO₂ für 0 h, 2 h bzw. 4 h inkubiert. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen zentrifugiert, 1x mit PBS gewaschen und lysiert. Die Quantifizierung der DDR Proteine erfolgte mittels Western Blot.

4. Ergebnisse

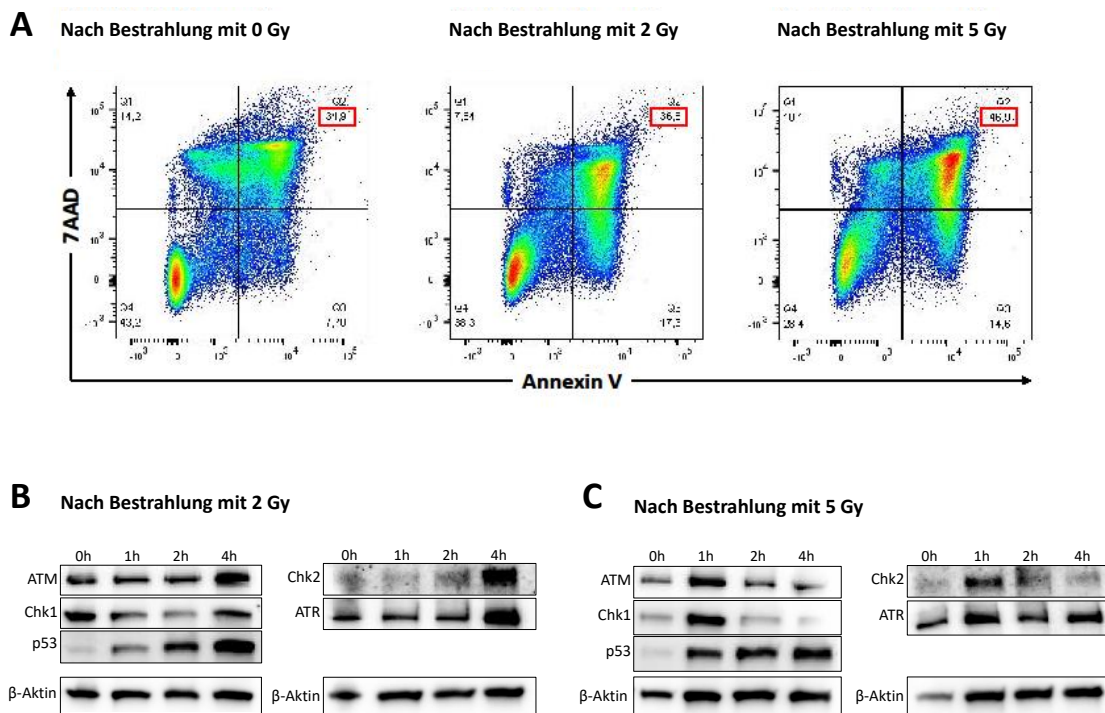


Abbildung 27. Apoptoserate und Proteinexpression nach Bestrahlung mit 2 bzw. 5 Gy
(A) Repräsentative Punktdiagramme von Thymozyten 10 h nach Bestrahlung mit 0, 2 oder 5 Gy. Apoptotische Zellen wurden definiert als Annexin V⁺ 7-AAD⁺ (rechter oberer Quadrant). **(B)** Thymozyten wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert und Western Blots wurden angefertigt. Nach Bestrahlung mit 2 Gy zeigten die untersuchten Proteine etwa 4 h nach Bestrahlung die maximale Expression. **(C)** Bei Bestrahlung mit 5 Gy zeigte sich bereits 1 h nach Bestrahlung eine maximale Expression der untersuchten Proteine.

Wie bereits durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, führt ein SLy1-Knockout in unbehandelten Thymozyten zu verstärkter Phosphorylierung und Überexpression von einigen DDR Proteinen (Schneider 2021). Barbara Schneider beobachtete dabei insbesondere signifikant erhöhte Werte für ATM und p-ATM, ATR und p-p53. Analog zu diesen Ergebnissen zeigten SLy1^{KO} Thymozyten zum Zeitpunkt „unbestrahlt“ auch in diesem Versuch eine erhöhte Expression der DDR Proteine. Dabei zeichnete sich vor allem für ATM und p-ATM sowie für ATR eine stark erhöhte Expression ab (Abbildung 28A und 29A, Zeitpunkt „unbestrahlt“). Die restlichen Proteine waren nur leicht erhöht. Aufgrund geringer Fallzahlen wurde von einer statistischen Auswertung der Expression zum Zeitpunkt „unbestrahlt“ abgesehen. Die absoluten und relativen Expressionswerte der untersuchten Proteine finden sich im Anhang in Tabelle 18 (Seite 116).

γ -Strahlung ist eine ionisierende elektromagnetische Strahlung und führt in Zellen zu Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen (Breimer 1988).

In **Wildtyp-Thymozyten** kam es unmittelbar nach Bestrahlung mit 2 Gy zu einem Anstieg von p-ATM um den Faktor 1,9 sowie von p-ATR.

2 h nach Bestrahlung war die Menge an p-ATR auf das 24,6-fache angestiegen. Die aktivierte Kinase p-ATR phosphoryliert Chk1. Zum Zeitpunkt 2 h war auch p-Chk1 auf die 23,6-fache Menge angestiegen. Eine maximale Expression zeigte zu diesem Zeitpunkt auch Chk1 (1,5-fach erhöht), ATM (3,0-fach erhöht), p53 (31,7-fach erhöht) sowie p-p53 (29,4-fach erhöht) und Mdm2 (2,3-fach erhöht).

Zum Zeitpunkt 4 h nach Bestrahlung war die Expressionsmenge der meisten Proteine bereits rückläufig, maximale Expression zeigte sich bei ATR (15-fach erhöht) und p-Chk2 (9,5-fach erhöht).

In **SLy1^{KO} Thymozyten** kam es unmittelbar nach Bestrahlung ebenfalls zur Hochregulation von p-ATM um den Faktor 1,5 und von p-ATR (14,0-fach erhöht).

Die sich nach 2 h anschließende erhöhte Menge an p-Chk1 war mit Faktor 6,0 deutlich sichtbar, fiel jedoch weniger stark aus als in Wildtyp-Zellen. Zum Zeitpunkt 2 h erreichten Chk1 (1,5-fach erhöht), p53 (20,5-fach erhöht), p-p53 (66,4-fach erhöht) sowie Mdm2 (5,1-fach erhöht) ihre maximale Expression.

In SLy1^{KO} Thymozyten zeigten p-ATR, p-ATM, Chk2 und p-Chk2 zu jedem der untersuchten Zeitpunkte eine höhere Expression als Wildtyp-Zellen. Auch Chk1 und p-Chk1 sowie p53 und p-p53 zeigten abgesehen vom Maximum (Zeitpunkt 2 h) in SLy1^{KO} Zellen eine höhere Expression als in Wildtyp-Zellen. Die Abbildungen 28 - 30 zeigen die Darstellungen der absoluten Proteinexpression (A und D) bzw. relativen Proteinexpression (C und F) (SLy1^{KO}/SLy1^{WT}) sowie repräsentative Western Blots (B und E) der Proteine zu den untersuchten Zeitpunkten.

Durch Varianzanalyse (*two-way* ANOVA) wurde der Effekt der Faktoren Genotyp ("Reagieren SLy1^{KO} und SLy1^{WT} Zellen unterschiedlich auf den Stimulus?") und Zeit ("Beeinflusst der Stimulus die Expression nach 2 h bzw. 4 h?") analysiert. Hier zeigte sich in der Expression von p-p53 ein signifikanter Effekt. Die Bestrahlung von Thymozyten mit 2 Gy γ -Strahlung führte innerhalb von zwei Stunden zu einer signifikant erhöhten Phosphorylierung von p53, die auch nach vier Stunden weiter anhielt (Abbildung 30A, Seite 77).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass SLy1^{KO} Thymozyten bereits im unbestrahlten Zustand eine Überexpression von einigen DDR Proteinen zeigten. Analog zu Wildtyp-Thymozyten zeigten auch sie nach Bestrahlung eine Überexpression der DDR Proteine als Reaktion auf den induzierten DNA-Schaden. Diese fiel jedoch für ATR, p-ATR, p-Chk, p-ATM und p53 weniger stark aus als in Wildtyp-Thymozyten. Eine stärkere Erhöhung als in Wildtyp-Thymozyten ließ sich bei p-Chk2, p-p53 und Mdm2 beobachten.

4. Ergebnisse

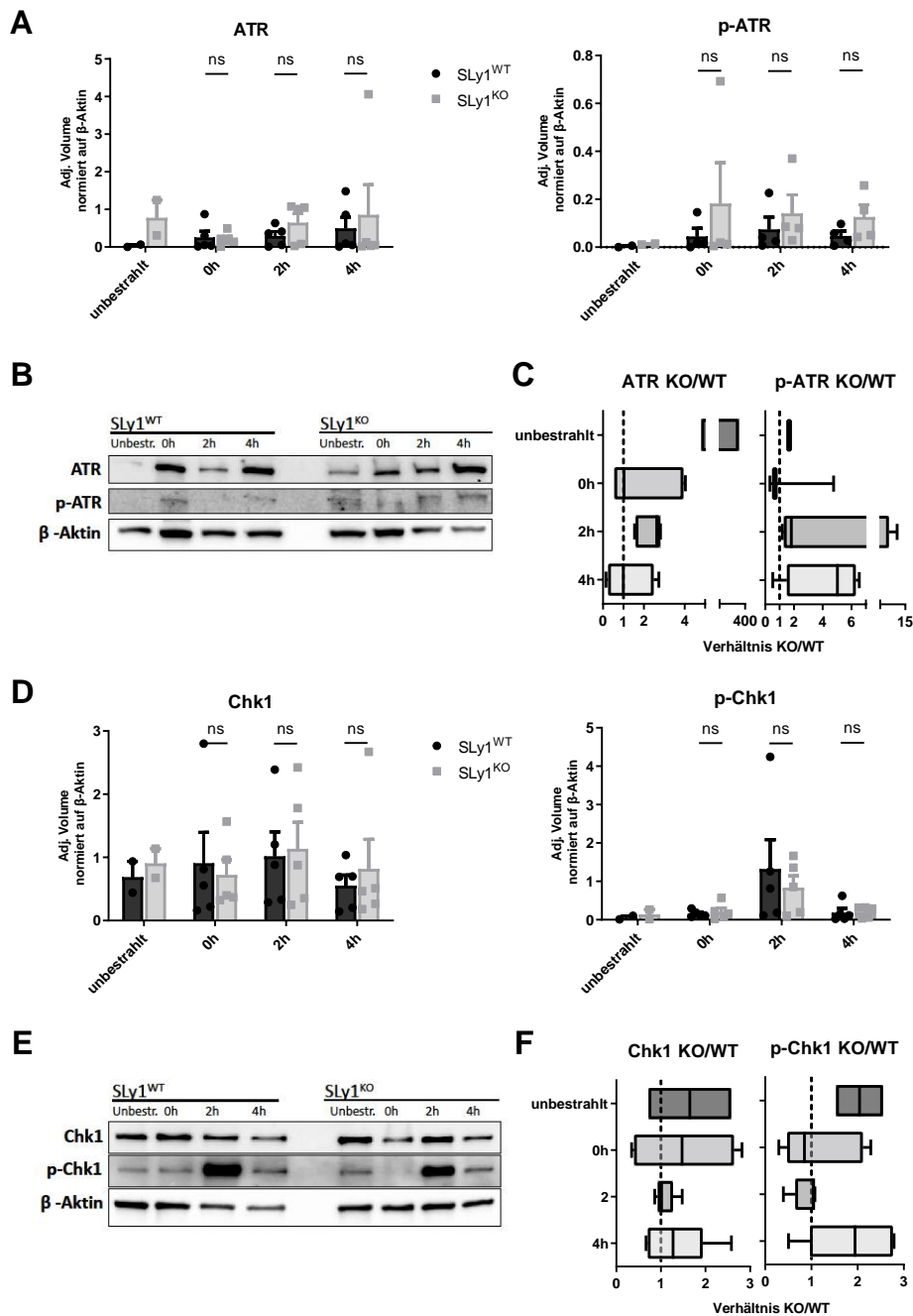


Abbildung 28. Quantifizierung der Expression und Phosphorylierung von ATR und Chk1 in bestrahlten Thymozyten

Thymozyten wurden bestrahlt und nach 0 h, 2 h und 4 h lysiert. Expression von (A) Gesamt-ATR und phosphoryliertem ATR (p-ATR) bzw. (D) Gesamt-Chk1 und p-Chk1. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Adj. Volume = Volumen der Bande nach Abzug des Hintergrundsignals. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (ns = nicht signifikant; Student's t-test). (B & E) Repräsentativer Western Blot von ATR und p-ATR bzw. Chk1 und p-Chk1. (C & F) Relatives Verhältnis der Proteinexpression von SLy1^{KO} Thymozyten zu SLy1^{WT} Thymozyten. Dargestellt sind der Median, die Quartilen und die beiden Extremwerte als Box-Whisker-Plot (n=5) bzw. für den Zeitpunkt „unbestrahlt“ beide Extremwerte als *Floating Bar* (n=2).

4. Ergebnisse

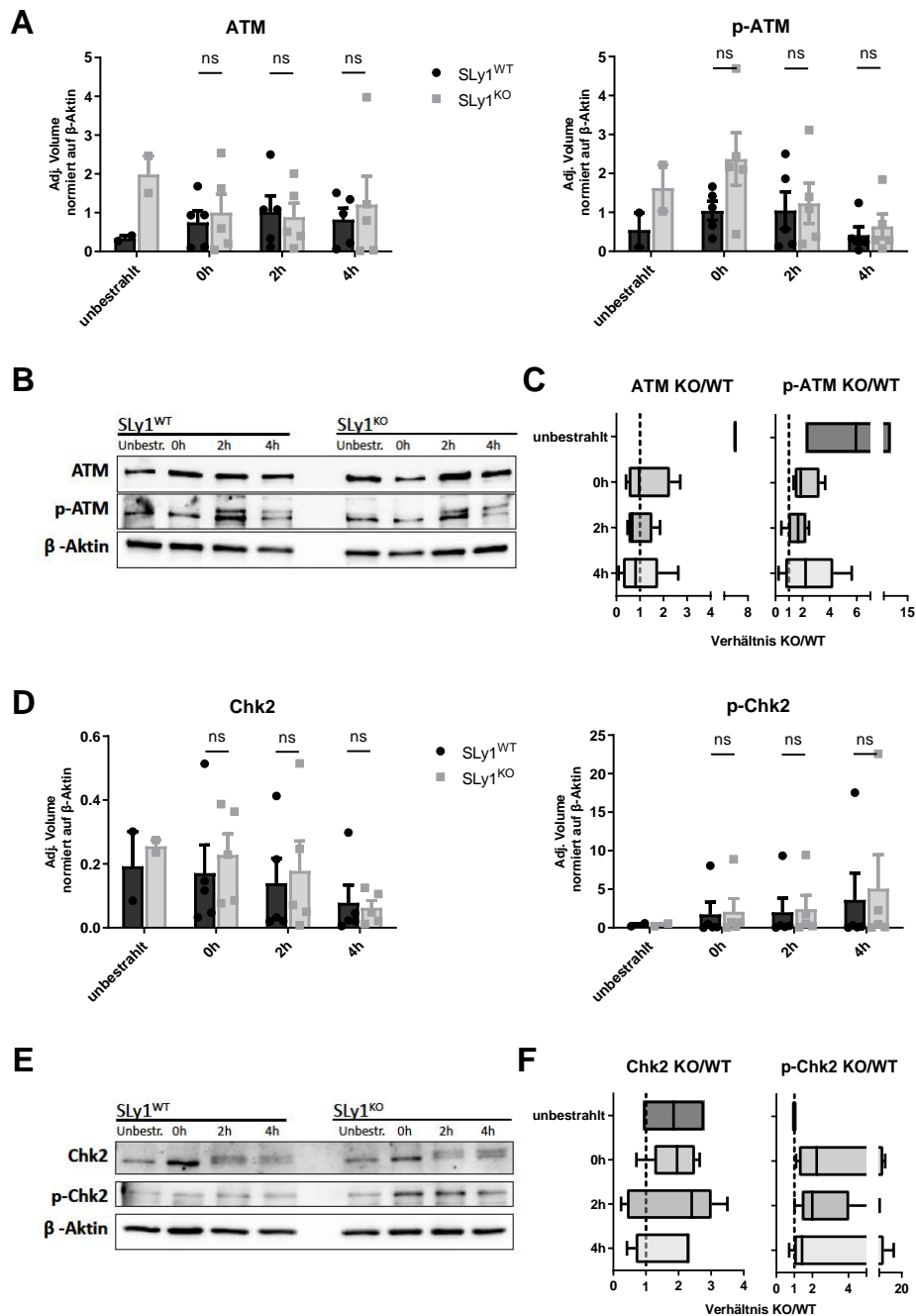


Abbildung 29. Quantifizierung der Expression und Phosphorylierung von ATM und Chk2 in bestrahlten Thymozyten

Thymozyten wurden bestrahlt und nach 0 h, 2 h und 4 h lysiert. Expression von (A) Gesamt-ATM und phosphoryliertem ATM (p-ATM) bzw. (D) Gesamt-Chk2 und p-Chk2. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Adj. Volume = Volumen der Bande nach Abzug des Hintergrundsignals. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (ns = nicht signifikant; Student's t-test). (B & E) Repräsentativer Western Blot von ATM und p-ATM bzw. Chk2 und p-Chk2. (C & F) Relatives Verhältnis der Proteinexpression von SLy1^{KO} Thymozyten zu SLy1^{WT} Thymozyten. Dargestellt sind der Median, die Quartilen und die beiden Extremwerte als Box-Whisker-Plot (n=5) bzw. für den Zeitpunkt „unbestrahlt“ beide Extremwerte als *Floating Bar* (n=2).

4. Ergebnisse

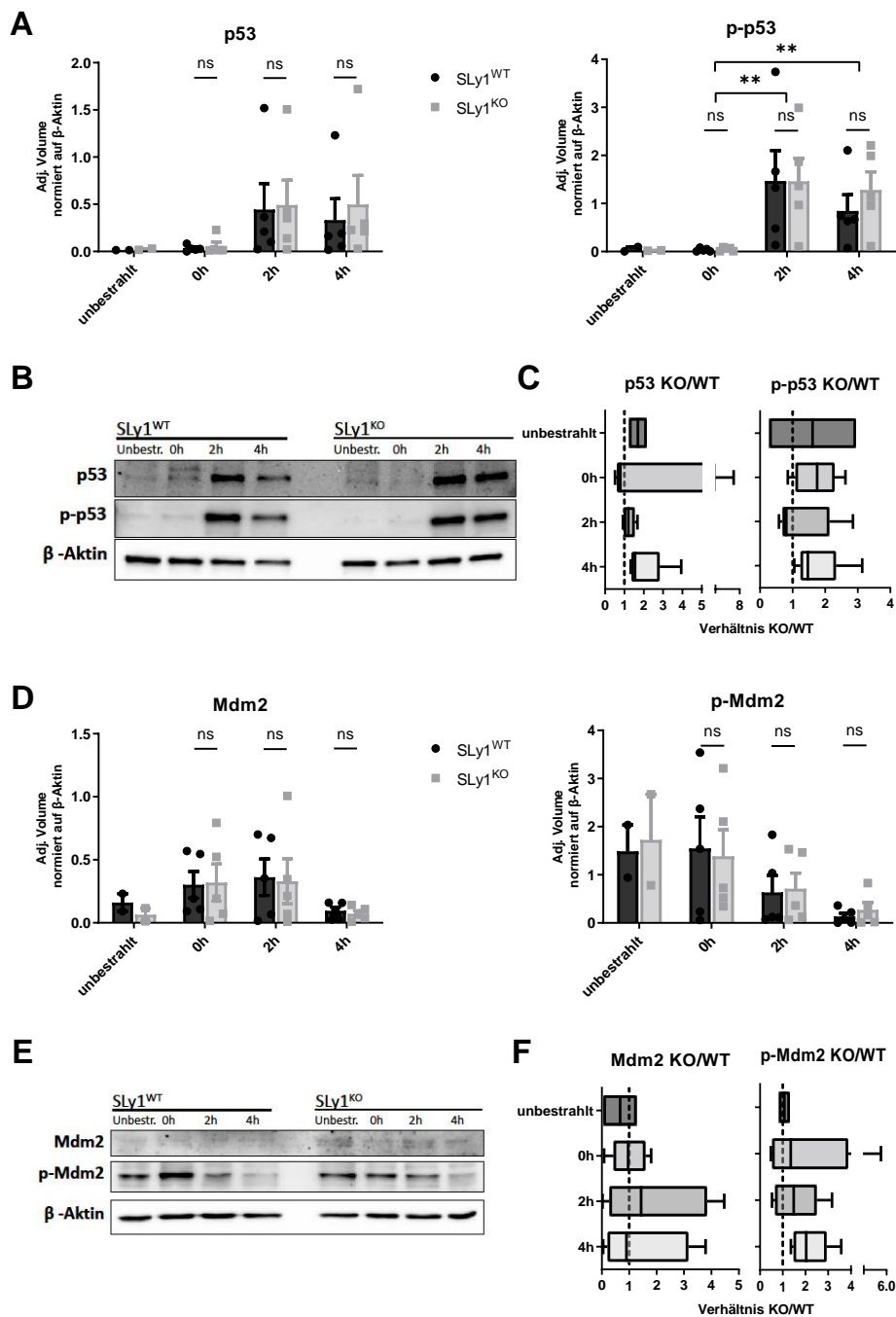


Abbildung 30. Quantifizierung der Expression und Phosphorylierung von p53 und Mdm2 in bestrahlten Thymozyten

Thymozyten wurden bestrahlt und nach 0 h, 2 h und 4 h lysiert. Expression von (A) Gesamt-p53 und phosphoryliertem p53 (p-p53) bzw. (D) Gesamt-Mdm2 und p-Mdm2. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Adj. Volume = Volumen der Bande nach Abzug des Hintergrundsignals. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD (**: $p < 0,01$; *two-way* ANOVA und ns = nicht signifikant; Student's t-test). (B & E) Repräsentativer Western Blot von p53 und p-p53 bzw. Mdm2 und p-Mdm2. (C & F) Relatives Verhältnis der Proteinexpression von SLy1^{KO} Thymozyten zu SLy1^{WT} Thymozyten. Dargestellt sind der Median, die Quartilen und die beiden Extremwerte als Box-Whisker-Plot (n=5) bzw. für den Zeitpunkt „unbestrahlt“ beide Extremwerte als *Floating Bar* (n=2).

4.2.3 SLy1 - ein Substrat der Kinasen ATM und ATR?

Das Adaptorprotein SLy1 kann in phosphoryliertem oder unphosphoryliertem Zustand vorliegen (Astoul et al. 2003). Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, wie bzw. durch welche Kinase SLy1 phosphoryliert werden kann. Um zu untersuchen, ob SLy1 ein Substrat der Kinasen ATM oder ATR ist, wurde ein Antikörper verwendet, der an phosphoryliertes Serin (pS) oder phosphoryliertes Threonin (pT) in (pS/pT) QG Motiven bindet. Bei dieser Sequenz handelt es sich um die Phosphorylierungsstelle von ATM und ATR. Dieser Antikörper (im Folgenden als p-ATM/ATR Substrate Antikörper bezeichnet) bindet also an alle Substrate von ATM oder ATR im phosphorylierten Zustand.

Für die Immunpräzipitation (IP) von SLy1 wurde Lysat von Splenozyten verwendet (vergleiche Kapitel 3.4.7). Als Negativkontrolle dienten Splenozyten aus SLy1^{KO}-Mäusen, die kein SLy1 aufweisen. Im Western Blot wurden neben dem immunpräzipitierten Material zwei Kontrollen mitgeführt. Die *cleared lysate* Kontrolle bestand aus dem Überstand des Lysates nach Immunpräzipitation. Sie weist alle Proteinbanden außer SLy1 auf. Die *input control* bestand aus Gesamtproteinlysate vor der Immunpräzipitation. Sie weist alle Proteinbanden auf. Abbildung 31 zeigt beispielhaft eine mit Ponceau S gefärbte Western Blot-Membran.

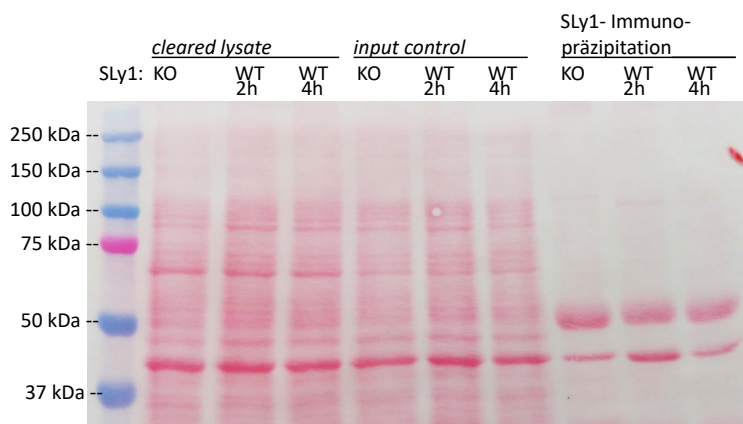


Abbildung 31. Immunpräzipitiertes SLy1 und Kontrollen nach der Ponceau S Färbung

Die Ponceau S Färbung diente als Qualitätskontrolle der IP. Die auf Höhe von 50 kDa zu sehenden Banden entsprechen der heavy chain des zur IP verwendeten Antikörpers. Das immunpräzipitierte SLy1 hat eine Größe von 55 kDa und ist ohne spezifische Färbung hier nicht zu erkennen.

Der p-ATM/ATR Antikörper erzeugt in der *input control* und der *cleared lysate* Kontrolle eine Vielzahl von Banden, da er eine hohe Affinität zu allen Substraten von ATM oder ATR besitzt (siehe Abbildung 32A, links). Nach Inkubation von immunpräzipitiertem SLy1 mit dem p-ATM/ATR Substrate Antikörper zeigten sich keine Banden auf Höhe von SLy1 (siehe roter Kasten in Abbildung 32A im Vergleich zu den Banden im rechten Blot).

4. Ergebnisse

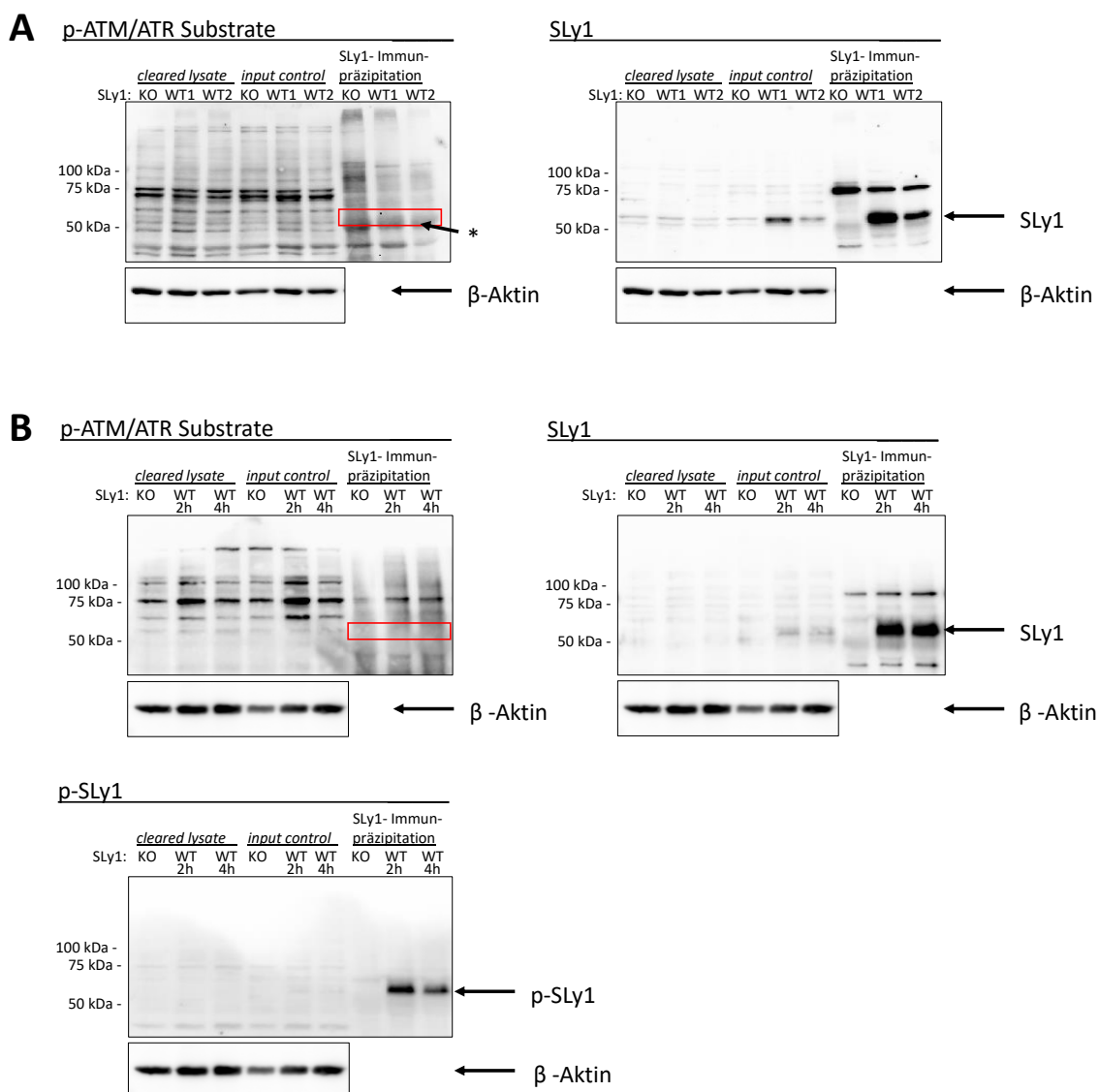


Abbildung 32. Affinität des p-ATM/ATR Substrate Antikörper zu immunpräzipitiertem SLy1

Western Blots nach Inkubation mit dem p-ATM/ATR Substrate Antikörper (links), SLy1 Antikörper (rechts) und p-SLy1 Antikörper (unten links). Der Nachweis von SLy1 diente zur Kontrolle der Immunpräzipitation. Auf Höhe von SLy1 (50 kDa, roter Kasten links) erzeugt der p-ATM/ATR Substrate Antikörper keine spezifische Bande. (A) SLy1^{WT/KO} Splenozyten wurden isoliert und SLy1 immunpräzipitiert. * Anmerkung: bei den Banden am Unterrand des Kastens handelt es sich vermutlich um IgG Fragmente (50 kDa) aus der Immunpräzipitation. (B) Thymozyten wurden isoliert und bestrahlt. Nach 2 h bzw. 4 h wurden sie lysiert und SLy1 immunpräzipitiert. Die Membran wurde mit p-SLy1 Antikörper inkubiert, um sicher zu stellen, dass SLy1 im phosphorylierten Zustand vorliegt (unten).

SLy1^{KO} Lysat diente als Negativkontrolle. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

input control: Lysat vor der Immunpräzipitation von SLy1, cleared lysate: Lysat nach der Immunpräzipitation von SLy1.

Damit konnte jedoch nicht sicher ausgeschlossen werden, dass SLy1 ein Substrat von ATM/ATR ist. Denkbar wäre auch, dass SLy1 erst auf einen Stimulus hin phosphoryliert wird. Daher wurde der Versuch wiederholt. Diesmal wurde die Immunpräzipitation mit Lysat aus Thymozyten (n=2) durchgeführt, die 2 h bzw. 4 h zuvor mit 2 Gy γ -Strahlung bestrahlt wurden. Abbildung 33 zeigt eine schematische Übersicht über den Versuchsablauf im Vergleich zum Vorversuch. Durch die Bestrahlung kommt es zu einer Aktivierung der DDR Signalkaskade und somit zu einer Aktivierung der Kinasen ATM und ATR. Um sicherzustellen, dass SLy1 nach der Bestrahlung im phosphorylierten Zustand vorliegt, wurde die Membran mit einem spezifischen p-SLy1 Antikörper inkubiert. Dieser erzeugte deutliche Banden auf Höhe von SLy1 (siehe Abbildung 32B, unten). Nach Inkubation mit dem p-ATM/ATR Substrate Antikörper zeigten sich jedoch auch hier keine Banden auf Höhe von SLy1 (siehe Abbildung 32B, links, roter Kasten).

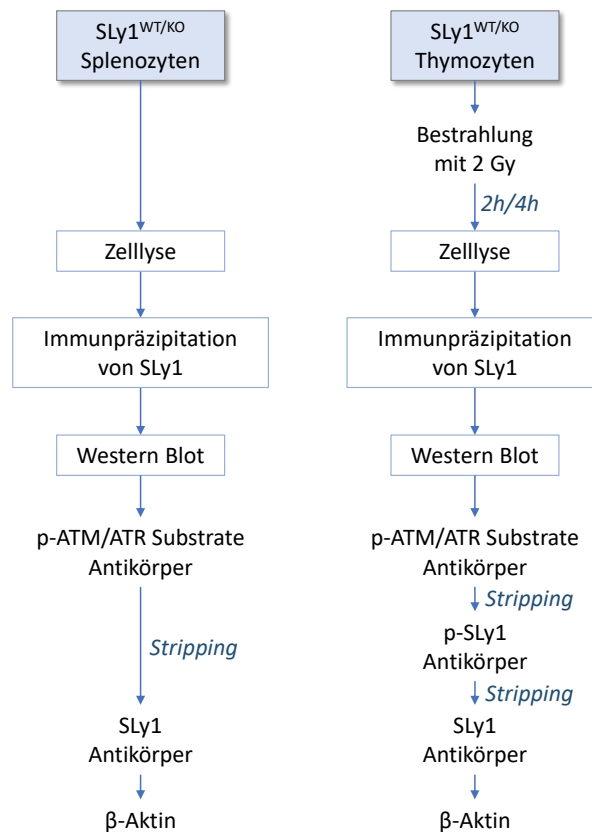


Abbildung 33. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur Untersuchung, ob SLy1 ein Substrat der Kinasen ATM oder ATR ist.

5

Diskussion

Ein Großteil unseres Wissens über NK-Zellen stammt aus murinen Milz-NK-Zellen oder humanen peripheren Blut-NK-Zellen. Für die Ausübung ihrer Hauptfunktionen, nämlich die Abtötung von virusinfizierten und maligne entarteten Zellen, stellt allerdings die Lunge einen wichtigen Ort des Geschehens dar. Eine eingeschränkte Funktion von NK-Zellen konnte zum Beispiel mit vermehrtem Auftreten von Lungentumoren (Kreisel et al. 2012), allergischen Atemwegserkrankungen (Karimi und Forsythe 2013) und *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) (Culley 2009) in Verbindung gebracht werden. Die Erforschung der verschiedenen organspezifischen NK-Zellen, insbesondere die der pulmonalen NK-Zellen, ist daher von großer Wichtigkeit. Das Ziel dieser Arbeit bestand deshalb darin, die phänotypischen Auswirkungen eines SLy1-Knockouts auf pulmonale NK-Zellen und deren Zusammenhang mit p53 zu untersuchen. Außerdem konnte das Wissen über SLy1^{KO} Milz-NK-Zellen um proteinbiochemische Analysen zur DDR Signalkaskade erweitert werden.

5.1 Diskussion der phänotypischen Untersuchungen von SLy1^{KO} und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen

Die Dysfunktion von NK-Zellen geriet in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der präklinischen und klinischen Forschung. NK-Zell-Dysfunktion wird häufig durch Messung der verminderten *in vitro* Zytotoxizität oder der verminderten IFN- γ - oder Granzym B-Produktion quantifiziert, sie zeichnet sich aber auch durch phänotypische Charakteristika wie *exhaustion*, Anergie oder Seneszenz aus (Judge et al. 2020).

Die Dysfunktion von SLy1^{KO} NK-Zellen setzt sich aus einer reduzierten NK-Zellzahl, ineffizienter Degranulation und verringerter Zytotoxizität gegenüber maligne entarteten Zellen zusammen und basiert auf einer ribosomalen Instabilität (Arefanian et al. 2016). Diese Charakterisierung von SLy1^{KO} NK-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit um erhöhte Seneszenzraten, eine schlechtere Überlebensfähigkeit in Kultur sowie um eine phänotypische Beschreibung von pulmonalen SLy1^{KO} NK-Zellen erweitert werden.

5.1.1 NK-Zellzahl in SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen

NK-Zellzahl in der Lunge

Es erfolgte die durchflusszytometrische Quantifizierung von pulmonalen NK-Zellen, um zu untersuchen, ob ein SLy1-Knockout Auswirkungen auf die Anzahl der NK-Zellen in der Lunge hat. Dabei zeigte sich eine hochsignifikant verringerte absolute Anzahl an NK-Zellen in der Lunge von SLy1^{KO} Mäusen, verglichen mit WT-Mäusen. Lag ein gleichzeitiger NK-zellspezifischer Knockout von p53 vor, bestand kein Unterschied zwischen SLy1^{WT}p53^{KO} und SLy1^{KO}p53^{KO} Mäusen. Auch durch Arefanian et al. konnte in peripheren Organen wie beispielsweise der Lunge von SLy1^{KO} Mäusen bereits eine reduzierte Anzahl von NK-Zellen beobachtet werden (Arefanian et al. 2016). In unserer Arbeitsgruppe wurden im letzten Jahr durch Carolin Blumendeller Vorarbeiten an pulmonalen NK-Zellen durchgeführt. Auch hier zeigte sich bereits eine signifikante Reduktion der NK-Zellen in der Lunge von SLy1^{KO} Mäusen, welche durch einen p53-Knockout wiederhergestellt werden konnten (Blumendeller 2022). Auf Basis der vorliegenden Arbeit und der Daten von C. Blumendeller kann der Schluss gezogen werden, dass SLy1 in NK-Zellen unabdingbar ist, um deren Vorkommen in der Lunge in physiologisch normaler Anzahl sicherzustellen und, dass die Verringerung der pulmonalen NK-Zellzahl, welche in SLy1^{KO} Mäusen beobachtet wurde, über p53 mediiert wird.

In WT-Mäusen betrug der Anteil der pulmonalen NK-Zellen aller CD45⁺ Leukozyten in der Lunge $7,2 \pm 1,9$ %. Auch C. Blumendeller beobachtete ähnliche Werte von 6,9 % aller CD45⁺ Leukozyten in der Lunge und 4,3 % in der Milz (Blumendeller 2022). Es zeigt sich also in unseren Daten ein Trend, nach dem der Anteil der NK-Zellen in der Lunge höher ist als in anderen peripheren Organen wie beispielsweise der Milz. Dies wurde auch von Gregoire et al., sogar in stärkerem Ausmaß, publiziert (Grégoire et al. 2007).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die von uns vorgefundene NK-Zellzahl in der Lunge von WT-Mäusen vergleichbar sind mit Vorbefunden (Blumendeller 2022) oder zumindest nicht in Diskrepanz dazu stehen (Grégoire et al. 2007). Dies spricht für eine hohe Qualität der Methode und eine gute Belastbarkeit der Daten.

Eine *minor limitation* der erhobenen Ergebnisse ist sicherlich die starke interindividuelle Streuung innerhalb der Genotypen (siehe Abbildung 11, Seite 44). Es könnte jedoch sein, dass dies ein generell bei pulmonalen NK-Zellen vorkommendes Phänomen ist. In einer schwedischen Studie wurde ebenfalls über eine starke Streuung berichtet, der Anteil an NK-Zellen in der Lunge schwankte dort erheblich zwischen 1 % und 60 % aller Lymphozyten (Marquardt, Kekäläinen et al. 2017).

NK-Zellzahl in der Milz

Eine Quantifizierung von Milz-NK-Zellen in $SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO}$ Mäusen wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits mittels Durchflusszytometrie durchgeführt (Blumendeller 2022). Um die Ergebnisse zu verifizieren, erfolgte in der vorliegenden Arbeit eine Quantifizierung von Splenozyten und Milz-NK-Zellen durch Auszählen der Zellen nach MACS-Isolierung. Dabei fanden sich in $SLy1^{KO}$ Mäusen hochsignifikant verringerte Splenozytenzahlen und hochsignifikant verringert absolute Milz-NK-Zellzahlen im Vergleich zu WT-Mäusen. Bei gleichzeitigem Vorliegen eines NK-zellspezifischen Knockouts von p53 zeigten sich keine unterschiedlichen Splenozytenzahlen zwischen $SLy1^{WT}p53^{KO}$ und $SLy1^{KO}p53^{KO}$ Mäusen, die absoluten NK-Zellzahlen waren jedoch weiterhin hochsignifikant verringert. Ein reduzierter Zellgehalt von lymphoiden Organen in $SLy1^{KO}$ Mäusen, insbesondere der Milz, wurden bereits vor einigen Jahren durch unsere Arbeitsgruppe beschrieben (Reis et al. 2009) und konnten hiermit für die Milz bestätigt werden. Auch bei Arefanian et al. und in der oben erwähnten durchflusszytometrischen Quantifizierung von Milz-NK-Zellen durch C. Blumendeller zeigte sich eine signifikante Reduktion der NK-Zellen in den Milzen von $SLy1^{KO}$ Mäusen (Arefanian et al. 2016; Blumendeller 2022). Es lässt sich daher der Schluss ziehen, dass $SLy1$ in NK-Zellen unabdingbar ist, um deren Vorkommen in der Milz in physiologisch normaler Anzahl sicherzustellen. Dies scheint außerdem nicht nur für NK-Zellen zuzutreffen. Wie durch unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden konnte, hat ein Globalknockout von $SLy1$ auch eine Verringerung der absoluten Anzahl von T- und B-Zellen in der Milz zur Folge (Beer, Scheikl et al. 2005).

Interessanterweise zeigte sich in der durchflusszytometrischen Quantifizierung der Milz-NK-Zellen durch C. Blumendeller kein Unterschied zwischen $SLy1^{WT}p53^{KO}$ und $SLy1^{KO}p53^{KO}$ Mäusen (Blumendeller 2022). Bei der Quantifizierung durch Auszählen nach MACS Isolation war die Anzahl in $SLy1^{KO}p53^{KO}$ Mäusen jedoch weiterhin hochsignifikant verringert. Eine *minor limitation* der gewählten Methode ist sicherlich, dass das händische Auszählen der NK-Zellen unter dem Mikroskop fehlerbehaftet sein könnte und dass im Gegensatz zur durchflusszytometrischen Quantifizierung die Zellen nach der Isolation nicht sicher als NK-Zellen identifiziert werden können.

5.1.2 Apoptose von $SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO}$ NK-Zellen

Wie durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, kommt es bei $SLy1^{KO}$ Milz-NK-Zellen zu einem erhöhten Auftreten von Apoptose, welches bei gleichzeitig vorliegendem NK-zellspezifischen p53-Knockout nicht mehr messbar war (Arefanian et al. 2016; Blumendeller 2022). Interessanterweise war der Anteil apoptotischer NK-Zellen in der Lunge

nicht von SLy1 abhängig. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{WT}p53^{WT} und SLy1^{KO}p53^{WT} bzw. SLy1^{WT}p53^{KO} und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen. Auch bei genauerer Betrachtung und Unterteilung in frühe und späte Apoptose zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Auch führte ein SLy1-Knockout nicht zu einer Abnahme der Zellgröße, wie es für apoptotische Zellen typisch wäre. Pulmonale SLy1^{KO}p53^{WT} und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen zeigten sogar höhere FSC und SSC Werte als WT-Zellen (vergleiche Abbildung 13, Seite 47). Es wäre denkbar, dass das Fehlen von SLy1 Auswirkungen auf die Stabilität der Zellen haben könnte und die labileren KO-Zellen dadurch vermehrt nekrotisch werden.

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass SLy1^{KO} NK-Zellen ein signifikant höheres Absterben in Kultur zeigten als WT-NK-Zellen.

Bemerkenswerterweise war der Anteil apoptotischer NK-Zellen in der Lunge von WT-Mäusen mit 13 % deutlich geringer als in der Milz mit durchschnittlich 24 % (Blumendeller 2022). Wie bereits erwähnt, weisen pulmonale NK-Zellen einige phänotypische Unterschiede zu Milz-NK-Zellen auf und setzen sich hauptsächlich aus reifen zirkulierenden NK-Zellen zusammen (Hervier et al. 2019). Es lässt sich der Schluss ziehen, dass SLy1 für das Überleben dieser Subgruppe nicht unabdingbar ist, sondern dass pulmonale NK-Zellen auch bei Vorliegen eines SLy1-Knockouts nicht verstärkt in Apoptose gehen.

5.1.3 Expression von Oberflächenrezeptoren

NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren.

Aktivierende Oberflächenrezeptoren

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass auf NK-Zellen aus der Milz von SLy1^{KO} Mäusen die Expression der aktivierenden Oberflächenrezeptoren NKG2D, NKp46, NK1.1 und Ly49H vermindert ist (Arefanian et al. 2016; Blumendeller 2022). Um zu untersuchen, ob dieses Phänomen auch NK-Zellen außerhalb der Milz betrifft, wurde die Expression dieser Rezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen quantifiziert. Bereits in Vorarbeiten hatte C. Blumendeller Versuche zur Quantifizierung der Expression von Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen durchgeführt, deren Methode in der vorliegenden Arbeit optimiert und die Anzahl der untersuchten Rezeptoren erweitert wurde. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression von **NKG2D, NKp46, NK1.1 und Ly49H** zwischen pulmonalen SLy1^{KO} und WT-NK-Zellen. Bei den Vorarbeiten von C. Blumendeller an pulmonalen NK-Zellen, zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in

der Expression von NKG2D, NKp46 und NK1.1 zwischen SLy1^{KO} und WT-NK-Zellen (Blumendeller 2022).

Die Stimulation von NK-Zellen führt zu einer Hochregulation des aktivierenden Oberflächenrezeptors **NKG2D** (Shi et al. 2018). Die Expression von NKG2D war auf pulmonalen SLy1^{KO} NK-Zellen nicht signifikant verändert im Vergleich zu WT-NK-Zellen.

In Mausstämmen mit eingeschränkter NK-Zell-Zytotoxizität wurde von Kreisel et al. eine vermehrte Tumorgenese von *Non-small cell lung cancer* (NSCLC) beschrieben (Kreisel et al. 2012). Es wäre denkbar, dass dabei tumorale Evasionsstrategien eine Rolle spielen, die dazu führen, dass eine Aktivierung von NK-Zellen und anderen Immunzellen verhindert wird. In der Literatur finden sich Hinweise, dass Tumore gezielt versuchen, eine Aktivierung von NK-Zellen über NKG2D zu verhindern. Dies kann entweder über Sekretion von NKG2D-Liganden oder über Sekretion des *transforming growth factor-β* (TGF-β) geschehen, welcher zur Herunterregulation der Expression von NKG2D-Liganden auf der Tumorzelle führt (Eisele et al. 2006). In SLy1-defizienten Mäusen wurde eine vermehrte Tumorgenese beschrieben (Arefanian et al. 2016). Ob dies direkt mit einer verminderten Expression von NKG2D auf NK-Zellen zusammenhängen könnte, wurde bisher nicht untersucht. Jedoch konnte gezeigt werden, dass Milz-NK-Zellen aus SLy1^{KO} Mäusen tatsächlich eine verringerte Expression von NKG2D aufwiesen (Blumendeller 2022).

SLy1^{KO} NK-Zellen zeigten eine signifikant höhere Expression von **Sca-1**, einem frühen und unselektiven Marker für aktivierte Lymphozyten (Fogel et al. 2013). Wie von Fogel et al. postuliert, gibt es jedoch widersprüchliche Evidenz darüber, ob Sca-1 auf Lymphozyten einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt hat. Außerdem kommen die Autoren in der Studie zu dem Schluss, dass die Expression und Funktion von Sca-1 speziell auf NK-Zellen letztlich nicht bekannt ist. Weitere Studien, um die Expression und Funktion von Sca-1 auf (pulmonalen) NK-Zellen zu untersuchen, sind daher notwendig, bevor die erhöhte Expression von Sca-1 auf pulmonalen SLy1^{KO} NK-Zellen interpretiert werden kann.

Inhibierende Oberflächenrezeptoren

Inhibierende Oberflächenrezeptoren spielen auf pulmonalen NK-Zellen eine wichtige Rolle. Generell gelten pulmonale NK-Zellen als hyporeaktiv; verglichen mit Milz-NK-Zellen weisen sie eine geringere Zytotoxizität und eine erhöhte Expression von inhibierenden Oberflächenrezeptoren auf (Michel et al. 2012). Wang et al. konnten auf pulmonalen NK-Zellen beispielsweise eine erhöhte Expression des inhibierenden Rezeptors CD94-NKG2A, verglichen mit NK-Zellen aus Milz oder Knochenmark, nachweisen. Sie schlussfolgerten

daraus, dass pulmonale NK-Zellen einen höheren *threshold* überwinden müssen, um aktiviert zu werden (Wang et al. 2012). Dieser Mechanismus könnte eine übermäßige Aktivierung von NK-Zellen verhindern und somit zu einer besseren Selbsttoleranz und zur Aufrechterhaltung der Integrität der Lungenzellen beitragen. Auch in Patienten mit SLy1-assoziiertes Immundefizienz fand sich eine schwere NK-Zell Lymphopenie mit einer erhöhten Expression von NKG2A (Delmonte et al. 2021).

In der vorliegenden Arbeit wurden die inhibierenden Rezeptoren KLRG1, Ly49A sowie CD94-NKG2A auf pulmonalen SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen quantifiziert.

Die Expression von **KLRG1** war auf den untersuchten pulmonalen SLy1^{KO} NK-Zellen gesteigert. Es zeigte sich eine hochsignifikant erhöhte MFI auf SLy1^{KO} NK-Zellen, verglichen mit WT-NK-Zellen. Dieser Unterschied war auch zwischen SLy1^{KO}p53^{KO} und SLy1^{WT}p53^{KO} NK-Zellen zu beobachten. Die erhöhte Expression von KLRG1 auf pulmonalen SLy1^{KO} NK-Zellen wäre (i) durch einen reifen Phänotyp der NK-Zellen, (ii) durch ein vermehrtes Auftreten von NK-Zell *exhaustion* oder (iii) durch vermehrte Aktivierung der NK-Zellen erklärbar. Auf diese drei Punkte soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

(i) Huntington et al. konnten zeigen, dass KLRG1⁺ NK-Zellen einen reifen Phänotyp sowie eine geringe Proliferationsrate aufweisen. Da NK-Zellen den Rezeptor KLRG1 erst während ihrer Entwicklung akkumulieren, wurden in Mausmodellen mit erhöhter NK-Zellzahl größerer Anteile KLRG1⁺ NK-Zellen beobachtet (Huntington et al. 2007). (ii) In einer Studie von Alvarez et al. konnte gezeigt werden, dass NK-Zellen nach andauernder Proliferation oder chronischer Stimulation in einen dysfunktionalen, sogenannten *exhaustion* Zustand übergehen, in welchem sie eine erhöhte Expression von KLRG1, verminderte Expression von NKG2D (Alvarez et al. 2019) und verminderte Expression des Transkriptionsfaktors EOMES aufweisen (Gill et al. 2012). Auch konnte gezeigt werden, dass bei der Induktion des *exhausted* Phänotyps die DDR Signalkaskade involviert ist, da eine Hemmung der DDR Signalkaskade zu einer Reduktion der *exhaustion* und besserer Tumorcarence *in vivo* führte (Alvarez et al. 2019).

In der vorliegenden Arbeit fanden sich erste Hinweise, dass pulmonale SLy1^{KO} NK-Zellen vermehrt in *exhaustion* gehen könnten. Sie zeigten eine starke Expression des *exhaustion* Markers KLRG1, jedoch keine verminderte Expression von NKG2D. Ob sie auch eine Dysfunktion, insbesondere eine verminderte Zytotoxizität aufweisen, muss in weiteren Studien untersucht werden. SLy1^{KO} Milz-NK-Zellen zeigten keine erhöhte Expression des *exhaustion* Markers KLRG1, jedoch eine verminderte Expression von NKG2D (Blumendeller 2022) und eine verminderte Expression des Transkriptionsfaktors EOMES sowie eine Dysfunktion (Arefanian et al. 2016).

(iii) Nach einer amerikanischen Studie gilt KLRG1 auf NK-Zellen auch als Marker früher, nichtspezifischer NK-Zellaktivierung (Fogel et al. 2013). Interessanterweise ließ sich auf pulmonalen SLy1^{KO} auch eine erhöhte Expression eines weiteren Aktivierungsmarkers (Sca-1) beobachten. Auf den von C. Blumendeller untersuchten Milz-NK-Zellen zeigten sich die erhöhte Expression von KLRG1 und Sca-1 nicht (Blumendeller 2022). Unsere Daten sprechen nicht für eine vermehrte Aktivierung pulmonaler NK-Zellen in SLy1^{KO} Mäusen. Zusätzlich zeigten sich in den Lungen von SLy1^{KO} Mäusen ansonsten keine Zeichen einer NK-Zellaktivierung, insbesondere keine erhöhte Expression von aktivierenden Rezeptoren oder Herunterregulation von inhibitorischen Oberflächenrezeptoren, wie es die Stimulation von NK-Zellen gewöhnlicherweise nach sich ziehen würde (Shi et al. 2018).

Der inhibierende Rezeptor **Ly49A** wird auf murinen NK-Zellen exprimiert, er ist jedoch nicht funktionsfähig, da sein Ligand H2^d im C57BL/6 Stamm nicht vorhanden ist (Hanke et al. 1999). Auf den hier untersuchten pulmonalen NK-Zellen aus C57BL/6 Mäusen war die Expression von Ly49A bei Vorliegen eines SLy1-Knockouts tendenziell verringert, auf SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen war diese sogar signifikant verringert im Vergleich zu SLy1^{WT}p53^{KO} NK-Zellen. Durchschnittlich waren 12 % der NK-Zellen positiv für Ly49A. Die geringe Expression und die von Hanke et al. postulierte Funktionslosigkeit des Rezeptors in C57BL/6 Mäusen fordern eine kritisch Beurteilung der erhobenen Daten bezüglich ihrer Übertragbarkeit und biologischen Relevanz.

Für **CD94-NKG2A** zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression zwischen den untersuchten Genotypen.

Eine zu nennende methodische Schwäche betrifft die von uns gewählte Methode der Isolation pulmonaler NK-Zellen. Für die Analyse von murinen pulmonalen NK-Zellen wurde die Lunge entnommen und, wie in Kapitel 3.1.3 beschrieben, aufbereitet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Antikörpermix aus CD45.2-FITC, CD3e-PacBlue und CD49b-APC inkubiert, durchflusszytometrisch analysiert und es wurde ein *gate* auf CD45.2⁺ CD3e⁻ CD49b⁺ NK-Zellen gesetzt. Diese Methode erlaubt jedoch nur einen sehr undifferenzierten Blick auf die Gruppe der pulmonalen NK-Zellen. Wie kürzlich gezeigt werden konnte, setzen sich pulmonale NK-Zellen aus verschiedenen Subgruppen zusammen; so bestehen sie zum Großteil (bis zu 80%) aus zirkulierenden NK-Zellen (Hervier et al. 2019) und nur zu einem kleinen Teil aus residenten NK-Zellen. Es ist davon auszugehen, dass sich ein Großteil der pulmonalen NK-Zellen zwischen Blut und Gewebe hin- und herbewegt (Marquardt, Kekäläinen et al. 2017). Die zirkulierenden NK-Zellen haben einen sehr reifen Phänotyp und exprimieren die *markers of residency* CD69, CD49a, CD103 kaum bis gar

nicht (Hervier et al. 2019). CD69 interagiert im Gewebe mit dem *sphingosine-1-phosphate receptor 1*, was die Zelle im Gewebe zurückhält und gilt außerdem als Aktivierungsmarker. Wir konnten CD69 nur auf 2,54 % der pulmonalen NK-Zellen nachweisen (siehe Kapitel 4.1.4), was dafürspricht, dass sich kaum gewebständige NK-Zellen in der von uns untersuchten Population befanden. Auch andere Autoren berichten, dass die überwiegende Mehrheit der pulmonalen NK-Zellen kein CD69 exprimiert, dort betrug der Anteil CD69⁺ NK-Zellen bis zu 20 % (Marquardt, Kekäläinen et al. 2017).

Des Weiteren wurden die Lungen in der vorliegenden Arbeit nicht perfundiert, es ist also davon auszugehen, dass sich unter den hier beschriebenen „pulmonalen“ NK-Zellen ein Großteil zirkulierender Blut-NK-Zellen befand.

5.1.4 Zytotoxizität von SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} NK-Zellen

Lungenkrebs zählt zu den häufigsten Todesursachen in Verbindung mit Krebserkrankungen in Deutschland (Erdmann et al. 2021). Den NK-Zellen wird eine wichtige protektive Rolle bei der Entstehung von Lungentumoren zugeschrieben (Kreisel et al. 2012). Mäuse, die keine NK-Zellen besitzen, entwickeln früh schweren Lungenkrebs (Cong et al. 2018).

Die Quantifizierung der Zytotoxizität von NK-Zellen erfolgt oft über *ex vivo* Zytotoxizitätsassays, wobei die Lysefähigkeit gegenüber Kulturzellen malignen Ursprungs analysiert wird. In den von uns durchgeführten Zytotoxizitätsassays mit *Lewis Lung Carcinoma* (LLC) Zellen zeigten SLy1^{KO} NK-Zellen keine verringerte Zytotoxizität. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den von Arefanian et al. publizierten Daten. Dort konnte gezeigt werden, dass SLy1^{KO} NK-Zellen LLC-Zellen *in vitro* weniger effizient lysieren und dass das Wachstum von LLC-Zellen *in vivo*, welches durch NK-Zellen kontrolliert wird, in SLy1^{KO} Mäusen beschleunigt ist (Arefanian et al. 2016).

Wie in Kapitel 3.3.9 beschrieben, wurde die Inkubation in 96-*well* Platten mit F-bottom durchgeführt. Zuvor wurden die Zellen zentrifugiert, damit sie sich zu Beginn der Inkubationszeit am Boden des *wells* befanden. Wie in der mikroskopischen Aufnahme gut sichtbar, bildeten die Zellen im F-bottom *well* kein Zellpellet (siehe Abbildung 34A, Seite 89). Somit sind Zell-Zell-Interaktionen zwischen den beiden Zellarten seltener als im U-bottom *well*, wo sich nach der Zentrifugation ein Zellpellet bildet (siehe Abbildung 34B).

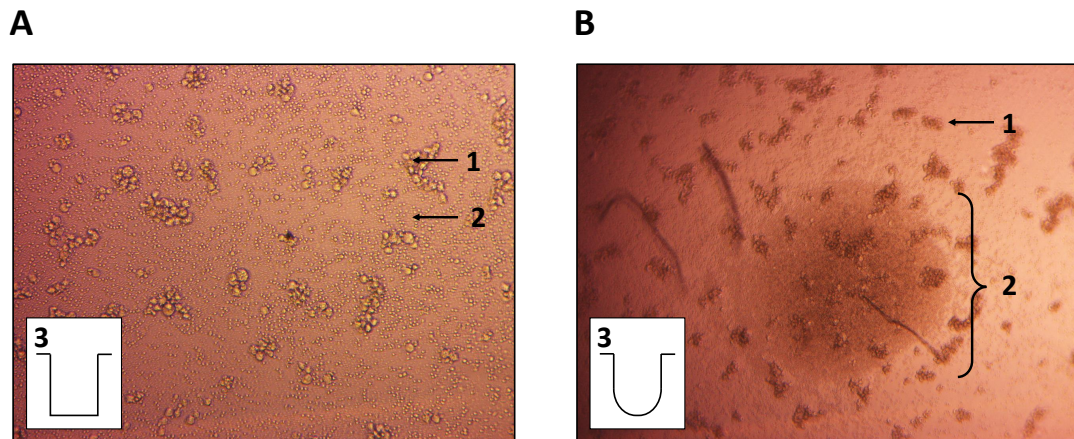


Abbildung 34. NK-Zellen und LLC-Zellen in der 96-well Platte mit verschiedenen Bodenformen

(A) NK-Zellen und LLC-Zellen in 96-well Platte mit F-bottom wells. (1): LLC-Zellen, (2): NK-Zellen, (3): Schematische Darstellung eines F-bottom wells. (B) NK-Zellen und LLC-Zellen in 96-well Platte mit U-bottom wells. (1): LLC-Zellen, (2): Zellpellet aus NK-Zellen und LLC-Zellen, (3): Schematische Darstellung eines U-bottom wells

Wir gehen davon aus, dass die Versuchsdurchführung mit F-bottom wells schlechte Voraussetzungen für ein Zytotoxizitätsassay bildet, da F-bottom wells eine Zellpelletbildung und somit Zell-Zell-Interaktionen erschweren. Der Versuch wurde mittlerweile innerhalb unserer Arbeitsgruppe durch C. Blumendeller unter Verwendung von 96-well Platten mit U-bottom wells wiederholt. Dabei konnten die Ergebnisse von Arefanian et al. reproduziert werden. SLy1^{KO} NK-Zellen lysierten LLC-Zellen signifikant schlechter als WT-NK-Zellen (Abbildung 35A). Außerdem konnte erstmals gezeigt werden, dass durch einen NK-zellspezifischen Knockout von p53 die reduzierte Zytotoxizität gegenüber LLC-Zellen wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 35B).

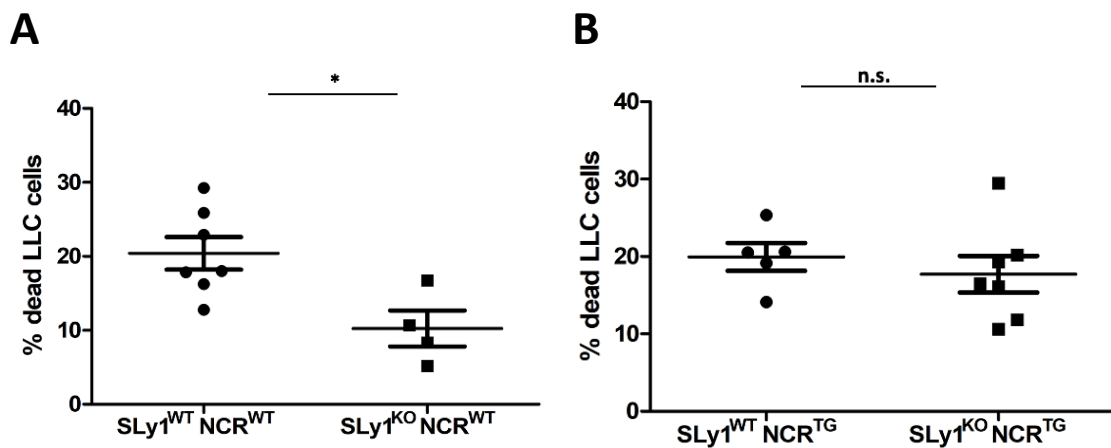


Abbildung 35. *In vitro* Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber LLC-Zellen

Abbildung aus der Dissertationsschrift von C. Blumendeller 2022 (Seite 53 und 59). Gezeigt ist der Anteil spezifisch lysierter LLC-Zellen nach vierstündiger Inkubation mit NK-Zellen der angegebenen Genotypen. (A) SLy1^{KO}p53^{WT} (hier bezeichnet als SLy1^{KO}NCR^{WT}) NK-Zellen zeigen eine signifikant reduzierte Zytotoxizität gegenüber LLC-Zellen im Vergleich zu SLy1^{WT}p53^{WT} (SLy1^{WT}NCR^{WT}) NK-Zellen. (B) Bei gleichzeitigem Vorliegen eines NK-zellspezifischen p53-Knockouts zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen SLy1^{WT}p53^{KO} (SLy1^{WT}NCR^{TG}) und SLy1^{KO}p53^{KO} (SLy1^{KO}NCR^{TG}) NK-Zellen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert \pm SD, n=4-7 (*: $p < 0,05$, n.s. = nicht signifikant; Student's t-test).

5.1.5 Zelluläre Seneszenz von SLy1^{KO} NK-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Anteil seneszenten NK-Zellen in der Lunge und Milz von SLy1^{WT/KO}p53^{WT/KO} Mäusen unterschiedlichen Alters bestimmt. Dabei zeigte sich, dass (i) ein SLy1-Knockout den Anteil seneszenten NK-Zellen in der Lunge und Milz erhöht und dass dieser Effekt nicht p53-abhängig ist. Neben der klassischen p53-medierten Induktion von Seneszenz durch die DDR Kaskade gibt es weitere p53-unabhängige Wege. Nach Aktivierung von ATR und Chk1 kann ein Checkpointarrest und in der Folge zelluläre Seneszenz p53-unabhängig über CDC25 induziert werden (Sulli et al. 2012). Wie in Kapitel 4.2.1 und 5.2.1 beschrieben, konnten in dieser Arbeit und von C. Blumendeller Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung des DDR Signalwegs in SLy1^{KO} NK-Zellen gefunden werden (Blumendeller 2022). Wir halten es für wahrscheinlich, dass diese verstärkte DDR Aktivierung für das erhöhte Auftreten von Seneszenz in SLy1^{KO} NK-Zellen verantwortlich sein könnte. Unsere Ergebnisse zeigten außerdem, dass (ii) pulmonale NK-Zellen unabhängig vom Genotyp und Alter der Mäuse eher in Seneszenz gehen als Milz-NK-Zellen. Bereits publizierte Daten belegen, dass in der Lunge eine Akkumulation von hochdifferenzierten NK-Zellen stattfindet (Marquardt, Kekäläinen et al. 2017; Wang et al. 2012) und dass sich pulmonale NK-Zellen phänotypisch von jenen in der Milz unterscheiden. Die vorliegenden Daten erweitern dieses Wissen um die Tatsache, dass auch seneszente NK-Zellen in Lungen von WT-Mäusen akkumulieren.

Des Weiteren belegen unsere Ergebnisse, dass **(iii)** in älteren Mäusen ein größerer Anteil seneszenten Zellen vorlag als in jüngeren Mäusen. In einer amerikanischen Studie wurde der Einfluss des Alterns auf murine NK-Zellen untersucht. Dabei fanden sich in 15-18 Monate alten Mäusen reduzierte NK-Zell Gesamtzahlen sowie weniger reife NK-Zellen in peripherem Gewebe im Vergleich zu 6-8 Wochen alten Mäusen (Beli et al. 2014). Dass unter älteren NK-Zellen auch mehr seneszente verkommen, ist nicht weiter verwunderlich. Bereits vor über 30 Jahren wurde gezeigt, dass mit jeder Zellteilung die Telomere der Chromosomen kürzer werden und dass dieser Prozess schlussendlich in die zelluläre Seneszenz führt (Harley et al. 1990). Es muss jedoch auch beachtet werden, dass die geschätzte Halbwertszeit von murinen NK-Zellen *in vivo* etwa 7-10 Tage beträgt (Yokoyama, Kim und French 2004). Es ist also nicht sicher, ob in den Lungen und Milzen von 20 Wochen alten Mäusen auch tatsächlich „ältere“ NK-Zellen analysiert wurden als in jungen Mäusen. Jedoch wäre denkbar, dass gerade in der Lunge ausgereifte NK-Zellen eine Nische finden, in der sie länger überleben könnten, als von Yokoyama postuliert. Dass es Ausnahmen gibt, bestätigt eine Studie an Primaten, in der für einzelne NK-Zell Klone ein Überleben von mehreren Monaten nachgewiesen wurde (C. Wu et al. 2018).

Die zweite Methode, die in dieser Arbeit zur Bestimmung der Seneszenzrate verwendet wurde, war die Quantifizierung mittels eines β -Galactosidase *tracers*. Hier zeigte sich eine ähnliche Tendenz in Richtung vermehrter seneszenten NK-Zellen in SLy1^{KO} Mäusen, jedoch war der Unterschied zu WT-NK-Zellen nicht signifikant. Bei der Messung wurde eine relativ hohe Hintergrundstrahlung gemessen, welche die Detektion der eigentlichen Signale erschwerte. Ein Grund dafür könnte in der geringen Zellzahl pro Röhrchen gelegen haben.

5.2 Diskussion der proteinbiochemischen Untersuchungen von SLy1^{KO} und SLy1^{KO}p53^{KO} NK-Zellen

5.2.1 Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen

Wie durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, findet in SLy1^{KO} NK-Zellen eine Hochregulation der mRNA Expression von Atr und Chk1 statt (Blumendeller 2022). Um zu überprüfen, ob daraus auch eine erhöhte Expression dieser und weiterer *DNA damage response* (DDR) Proteine resultiert, erfolgte deren Quantifizierung mittels klassischem Western Blot und mittels eines kapillarbasierten Immunoblotverfahren (WES). Es zeigten sich tendenziell erhöhte Proteinlevel von ATR und p-ATR sowie p-ATM in SLy1^{KO} NK-Zellen, diese waren jedoch nicht signifikant. Das gleichzeitige Auftreten der von C. Blumendeller beschriebenen erhöhten mRNA Expression und der in der vorliegenden Arbeit beobachteten tendenziellen Erhöhung der Proteine ATR und p-ATR machen es wahrscheinlich, dass in SLy1^{KO} NK-Zellen eine verstärkte Aktivierung des ATR/Chk1 Signalweges stattfinden könnte. Auch eine parallel stattfindende verstärkte Aktivierung des ATM/Chk2 Signalweges wäre denkbar und lässt sich anhand der erhobenen Daten nicht ausschließen.

Mit dem *impaired ribosome biogenesis checkpoint* (IRBC) wurde in Kapitel 1.3.1 ein möglicher Weg beschrieben, wie die ribosomale Instabilität in SLy1^{KO} NK-Zellen zu einem p53-abhängigen Zell-Zyklus Arrest führen könnte. Tritt die Zelle aber doch in die S-Phase ein, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es durch Mangel an Nukleotiden zu replikativem Stress, genomischer Instabilität und einer Aktivierung des DDR Signalweges kommt (Y.-C. Liu et al. 2008). Nukleotide werden für die DNA Replikation und Reparatur benötigt, es konnte allerdings gezeigt werden, dass 80 % der Nukleotide in einer Zelle für die Ribosomogenese verwendet werden (Pelletier, Thomas et al. 2017). Der durch gestörte Ribosomogenese induzierte IRBC G1 Arrest stellt deshalb die erste Folge eines Nukleotidmangels dar (Pelletier, Riaño-Canalias et al. 2020). Wir halten es für wahrscheinlich, dass auch in SLy1^{KO} NK-Zellen eine Form der *Nucleotid depletion* auftreten könnte. In SLy1^{KO} NK-Zellen tritt durch die Abwesenheit von SLy1 eine ribosomale Instabilität auf, welche eine gesteigerte Ribosomogenese und damit einen großen Bedarf an Nukleotiden nach sich ziehen könnte. Es wurde bereits beschrieben, dass ein Mangel an Nukleotiden in Zellen zur Phosphorylierung von p53 und Chk1 und zur Aktivierung von ATR führt (Pelletier, Riaño-Canalias et al. 2020). Von Ma et al. konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der rRNA Synthese durch Actinomycin D zu *Nucleolar stress* führte (Ma und Pederson 2013). Der Nukleolus ist der Ort, an dem die Synthese von ribosomaler RNA (rRNA) und

die Bildung der werdenden Ribosomen stattfindet (Pederson 2010). In der Folge kam es auch hier zu einer Akkumulation von p53 (Pelletier, Riaño-Canalias et al. 2020) und zu einem ATR- und p-Chk1 vermittelten Zellzyklusarrest (Ma und Pederson 2013). Übertragen auf unsere Forschung an SLy1^{KO} NK-Zellen sind diese Ergebnisse insofern interessant, da sie eine Verbindung zwischen ribosomaler Dysfunktion und dem DDR Signalweg schaffen. Es wäre also denkbar, dass die ribosomale Instabilität in SLy1^{KO} NK-Zellen zu einer Aktivierung des ATR/Chk1 Signalweges führt, welcher dann letzten Endes in der Seneszenz, *Exhaustion* oder auch Apoptose der Zelle endet. Zusammengefasst ist diese Hypothese in Abbildung 36 zu sehen, welche diesen potentiellen Mechanismus der Auslösung von NK-Zell-Dysfunktion durch einen Knockout von SLy1 zeigt.

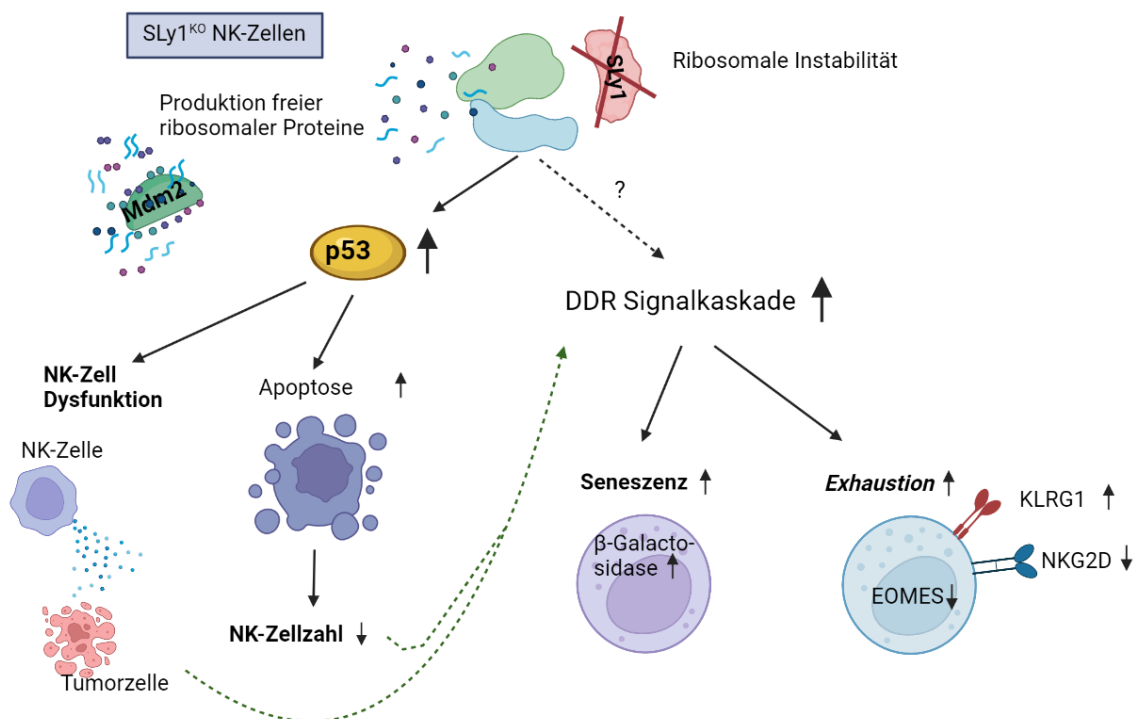


Abbildung 36. Potentieller Mechanismus der durch einen SLy1-Knockout induzierten NK-Dysfunktion

Ein Knockout von SLy1 in NK-Zellen führt zu ribosomaler Instabilität. Durch die daraus resultierende Entstehung von freien ribosomalen Proteinen kommt es zu einer Akkumulation von p53 (Arefanian et al. 2016), was eine NK-Zell-Dysfunktion, vermehrte Apoptose und eine sinkende NK-Zellzahl zur Folge hat. Außerdem kommt es (wahrscheinlich durch einen chronischen Proliferationsstimulus und *Nucleolar depletion*) zu replikativem Stress und zur Aktivierung der DDR Signalkaskade, was die Induktion von Seneszenz oder NK-Zell *Exhaustion* zur Folge hat.

Eine Schwäche der durchgeführten Versuche lag im fehlenden Nachweis von p-Chk2 in NK-Zellen. Leider gelang uns die Detektion von p-Chk2 mit dem verwendeten Phospho-Chk2 (Thr68) Antikörper der Firma Thermo Fisher nicht. Im WES war auf der Höhe von Chk2/p-Chk2 keine Bande sichtbar. Abbildung 37 zeigt einen Beispielblot aus der Auswertung der

WES Daten. Auch in den zuvor durchgeführten Analysen mittels klassischem Western Blot zeigte sich keine Bande, welche sicher als p-Chk2 Bande hätte identifiziert werden können. Der gleiche Antikörper wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits durch Barbara Schneider zur Quantifizierung von p-Chk2 in Thymozytenlysat eingesetzt (Schneider 2021). Auch dort zeigten sich erhebliche Schwierigkeiten bei der Detektion der Banden. Dies trat auch beim Einsatzes größerer Proteinmengen pro *lane*, welche in der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden konnten, auf.

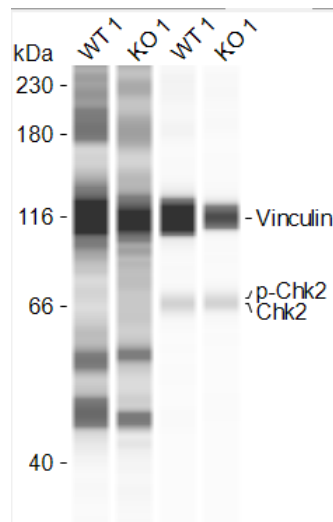


Abbildung 37. WES *lane view* von p-Chk2 und Chk2 in NK-Zellen

Die linken beiden *lanes* zeigen die Proteine nach Inkubation mit dem p-Chk2 Antikörper. Die Höhe, auf der p-Chk2 Banden zu erwarten wären, ist rechts markiert. Ein Nachweis von p-Chk2 in NK-Zellen war nicht möglich. Die rechten beiden *lanes* zeigen zum Vergleich die Auswertung nach Inkubation mit dem Chk2 Antikörper.

SLy1^{KO} NK-Zellen zeigten keine veränderte Expression von p53 im Vergleich zu WT-NK-Zellen. Dieses Ergebnis steht in Diskrepanz zu der von Arefanian et al. berichteten verstärkten Expression bzw. Akkumulation von p53 in SLy1^{KO} NK-Zellen. Arefanian et al. konnten außerdem auch zeigen, dass das akkumulierende p53 funktional aktiv ist: eine Vielzahl von Zielgenen von p53 waren in SLy1^{KO} NK-Zellen ebenfalls erhöht (Arefanian et al. 2016).

Mdm2 war tendenziell, jedoch nicht signifikant, erniedrigt in SLy1^{KO} NK-Zellen. In den publizierten Daten von Arefanian et al. fanden sich in der Co-Immunpräzipitation von Mdm2 ähnliche Mengen der Ubiquitinligase Mdm2 in SLy1^{KO} und WT-NK-Zellen (Arefanian et al. 2016).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein SLy1-Knockout in NK-Zellen eine ribosomale Instabilität auslöst, was zur Bildung freier ribosomaler Proteine führt. Diese bilden einen Komplex mit Mdm2 und verhindern dadurch dessen Interaktion mit p53, was eine Akkumu-

lation von p53 nach sich zieht. Über p53 mediiert kommt es dann zur Aktivierung des IRBC und zum Zellzyklusarrest, zur Apoptose und Dysfunktion der NK-Zellen. Zusammen mit den Ergebnissen von C. Blumendeller konnten wir bezüglich der NK-Zellzahl, Apoptose und Zytotoxizität von NK-Zellen sowohl eine Reduktion durch den SLy1-Knockout als auch die Vermittlung über p53 nachweisen.

Über den daraus resultierenden anhaltenden Proliferationsstimulus, aber auch einen Mangel an Nukleotiden durch eine gesteigerte Ribosomogenese kommt es zu replikativem Stress in den NK-Zellen. Dieser führt zu DNA-Schäden und einer Aktivierung der DDR Signalkaskade, welche NK-Zell *Exhaustion* oder Seneszenz auslösen kann. Wir konnten zeigen, dass SLy1^{KO} NK-Zellen tendenziell eine erhöhte Expression von DDR Proteinen aufwiesen. Außerdem zeigten sie eine vermehrte Expression des *Exhaustion* Markers KLRG1 und lagen vermehrt in seneszentem Zustand vor. Sowohl *Exhaustion* als auch Seneszenz waren nicht p53-abhängig.

5.2.2 Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in Thymozyten nach induziertem DNA-Schaden

Ob sich die Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in unbehandelten SLy1^{KO} und SLy1^{WT} Thymozyten unterscheiden, wurde bereits durch unsere Arbeitsgruppe untersucht. Dabei zeigte sich in SLy1^{KO} Thymozyten eine signifikant erhöhte Expression von ATM und ATR sowie von Chk1, Chk2 und p53 (Schneider 2021; Gruber 2021). Außerdem wurden von Lena Gruber erhöhte ATM mRNA-Level in SLy1^{KO} Thymozyten beschrieben (Gruber 2021). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse größtenteils reproduziert werden. Zum Zeitpunkt "unbestrahlt" zeigten sich auch hier tendenziell erhöhte Werte von ATM, p-ATM und ATR in SLy1^{KO} Thymozyten. Erklären ließe sich dies durch eine dauerhafte Aktivierung der DDR Signalkaskade, beispielsweise durch fehlerhafte Replikation und dadurch entstehende DNA-Schäden.

Die Verwendung von ionisierender Strahlung zur Induktion von DNA-Schäden ist eine etablierte und häufig angewandte Methode. Ionisierende Strahlung führt in der Zelle zur Induktion von Basenschäden, Einzelstrangbrüchen sowie komplexen Doppelstrangbrüchen und damit zur Aktivierung von ATM-abhängigen (Doppelstrangbrüche) oder ATR-abhängigen (Einzelstrangbrüche und Basenschäden) Signalkaskaden (Jeggo und Löbrich 2006). P53 wird in Folge von DNA-Schäden hochreguliert (hauptsächlich durch verminderten Mdm2-vermittelten Abbau) und seine Aktivität als Transkriptionsfaktor erhöht sich (Lee und Thangue 1999). Die in dieser Arbeit beobachtete, auf DNA-Schädigung folgende Hochregulation von p-ATR, ATR, p-Chk, p-ATM und p53 fiel in SLy1^{KO} Thymozyten tendenziell weniger stark aus als in Wildtyp-Thymozyten, war jedoch nicht signifikant

unterschiedlich. Es wäre dennoch denkbar, dass eine weniger starke Aktivierung der Signalkaskade eine effektive Reparatur von DNA-Schäden in Thymozyten verhindern könnte. Reis et al. haben in SLy1^{KO} Thymozyten erhöhte Anteile apoptotischer Zellen gemessen (Reis et al. 2009), was eine Folge insuffizienter Schadensreparatur sein könnte.

Signifikant zeigte sich die Zunahme der Phosphorylierung von p53, welche 2 h nach Bestrahlung auftrat, jedoch keine Unterschiede zwischen SLy1^{WT/KO} Thymozyten zeigte. Die Phosphorylierung von p53 nach DNA-Schaden geschieht in Abhängigkeit von ATM (Banin et al. 1998).

Mdm2 zeigte direkt nach der Bestrahlung einen deutlichen Anstieg. Eine Hochregulation der mRNA von Mdm2 infolge einer Bestrahlung wurde bereits von Chao et al. (2003) um den Faktor 1,6 beschrieben und konnte in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene bestätigt werden.

Auch wenn die Ergebnisse der durchgeführten Versuche in die erwartete Richtung weisen, waren sie bis auf die Erhöhung von p-p53 nicht signifikant. Dies könnte an der starken Streuung der Daten liegen. Eventuell war der Beobachtungszeitraum nach Bestrahlung mit 4 h zu kurz, wobei dies ein in der Literatur üblicher Zeitraum für die Analyse von Phosphorylierung nach DNA-Schaden ist. In einer amerikanischen Studie konnte gezeigt werden, dass die Expression von ATM und ATM-Substraten innerhalb der ersten Stunde nach induziertem DNA-Schaden ein Maximum erreichen, die Expression und Phosphorylierung von p53 nach etwa 4 h (Zhao et al. 2009). Auch denkbar wäre, dass die Bestrahlung mit 2 Gy nicht ausreichend DNA-Schäden induzierte, um eine Aktivierung der DDR Signalkaskade im Western Blot sichtbar zu machen. Wenn man davon ausgeht, dass nur ein kleiner Prozentsatz der Zellen einen DNA-Schaden und somit eine Phosphorylierung und Aktivierung der DDR Signalkaskade erfährt, wäre außerdem ein durchflusszytometrischer Ansatz sensitiver und damit wahrscheinlich geeigneter. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit die vermehrte Aktivierung des DDR Signalwegs in Thymozyten bestätigt werden und erstmals die unterschiedliche Reaktion des DDR Signalwegs in SLy1^{WT/KO} Thymozyten auf induzierten DNA-Schaden beurteilt werden. Es lässt sich der Schluss ziehen, dass viele DDR Proteine in SLy1^{KO} Thymozyten vor der Bestrahlung bereits erhöht vorliegen. Denkbar wäre deshalb, dass diese Zellen nicht die Möglichkeit haben, ausreichend stark auf den DNA-Schaden zu reagieren.

Zu untersuchen bleibt, wie SLy1^{WT/KO} NK-Zellen, in denen SLy1 eine völlig andere Funktion hat als in Thymozyten, auf eine Bestrahlung reagieren und ob auch sie bei Vorliegen eines SLy1-Knockouts weniger effizient auf einen induzierten DNA-Schaden reagieren als WT-Zellen.

5.2.3 SLy1 - ein Substrat der Kinasen ATM und ATR?

SLy1 weist an der Position Ser-27 eine Phosphorylierungsstelle auf, welche in B- und T-Zellen durch Serinkinasen phosphoryliert wird, wenn die B- oder T-Zellrezeptoren stimuliert werden (Astoul et al. 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dafür weder die Kinase ATM noch ATR verantwortlich ist. Immunpräzipitiertes SLy1 aus Splenozyten- und Thymozytenlysat zeigte keine Affinität zu einem Antikörper, welcher Substrate von ATM und ATR bindet. Dieser Antikörper bindet an Proteine, die ein phospho-Ser oder phospho-Thr enthalten, auf das ein Gln oder Gly folgt. Insgesamt besitzt SLy1 acht Mal das Motiv SG, dreimal TG sowie einmal TQ und einmal SQ (Beer, Simins et al. 2001). Es wäre also theoretisch denkbar gewesen, dass SLy1 ein Substrat von ATM oder ATR hätte sein können. Die oben beschriebene Phosphorylierungsstelle Ser-27 kam nicht in Frage, auf das Ser-27 folgt ein Phenylalanin und damit ist eine Phosphorylierung dieser Stelle durch ATM oder ATR unwahrscheinlich. Basierend auf den Ergebnissen, die trotz eines Nachweises von p-SLy1 keine Affinität des p-ATM/ATR Substrate Antikörpers zu immunpräzipitiertem SLy1 zeigten, gehen wir davon aus, dass SLy1 kein Substrat von ATM oder ATR ist.

5.3 Klinische Relevanz und Ausblick

NK-Zellen werden seit Jahrzehnten als mögliche Therapie im Kampf gegen Krebs erforscht, da sie in der Lage sind, transformierte Zellen MHC-unabhängig zu erkennen und zu töten. Viele Tumorzellen verlieren bzw. unterdrücken ihre MHC-Expression und entgehen dadurch der Immunosurveillance. NK-Zellen sind über ihre Fähigkeit zur *missing self* Erkennung in der Lage, Tumorzellen mit reduzierter oder fehlender MHC-Expression zu eliminieren. Diese NK-zellspezifische Fähigkeit ist ein Alleinstellungsmerkmal und unterstreicht die klinische Relevanz der Forschung an NK-Zellen. Klinische Studien zur Verwendung von NK-Zellen als Antitumorthherapie gibt es seit vielen Jahren, jedoch blieben bahnbrechende klinische Erfolge bisher aus, mutmaßlich aufgrund von *in vivo* NK-Zell-Dysfunktion (Suen et al. 2018). Ein besseres Verständnis der Dysfunktion von NK-Zellen, von Signalwegen, die zu Dysfunktion führen, sowie von Seneszenz und *exhaustion* helfen nicht nur, mit Immundefizienz assoziierte Krankheiten besser zu verstehen, sondern schaffen auch die Basis für die weitere Entwicklung und Optimierung NK-zellbasierter Therapien.

In den letzten Jahren wurden zwar große Fortschritte in der Charakterisierung von NK-Zellen erzielt, die detaillierte Charakterisierung von gewebsständigen NK-Zellen in der Lunge weist jedoch weiterhin Lücken auf. Die weitere Versuchsplanung in unserer Ar-

beitsgruppe sieht vor, bei zukünftigen Analysen pulmonaler NK-Zellen die verschiedenen Subgruppen zu berücksichtigen. Dafür sollen über eine bronchoalveoläre Lavage die pulmonalen Oberflächen-NK-Zellen gewonnen werden sowie vor der Isolation pulmonaler NK-Zellen die im Blut befindlichen NK-Zellen durch Perfusion der Lungen aus dem Gewebe entfernen werden. Die einzelnen NK-Zell Subgruppen sollen dann bezüglich der Auswirkung eines SLy1- (und p53-)Knockouts auf Apoptose, Seneszenz, Differenzierung sowie die Expression von aktivierenden und inhibierenden Oberflächenmarkern analysiert werden.

Ein weiterer interessanter Ansatz wäre, *ex vivo* Zytotoxizitätsassays mit pulmonalen NK-Zellen aus SLy1^{KO} und WT-NK-Zellen durchzuführen. Obwohl NK-Zellen als „ready to kill“ gelten, wäre dafür wahrscheinlich eine vorherige IL-15 Stimulation notwendig. Im Gegensatz zu humanen NK-Zellen besitzen naive NK-Zellen aus Mäusen aus SPF-Haltung keine Perforin und Granzym B Granula und weisen daher eine geringere Effektorfunktion auf (Fehniger et al. 2007). Durch Stimulation muriner NK-Zellen mit IL-15 wird vorhandene mRNA von Perforin und Granzym B translatiert und die Zelle somit handlungsfähig für eine Zytolyse (Fehniger et al. 2007). Robinson et al. konnten zeigen, dass humane pulmonale NK-Zellen, die mittels bronchoalveolärer Lavage oder aus Lungenparenchym gewonnen wurden, eine geringere Zytotoxizität aufweisen als Blut-NK-Zellen (Robinson et al. 1984).

Leider gelang es uns nicht, die durchflusszytometrisch beobachtete erhöhte Seneszenzrate in SLy1^{KO} Mäusen durch eine Quantifizierung mittels β -Galactosidase *tracer* zu verifizieren. Dies könnte, wie in Kapitel 5.1.5 diskutiert, an einer zu geringen Zellzahl pro Röhrchen gelegen haben. In unseren Augen wäre eine Versuchswiederholung mit einer höheren Anzahl NK-Zellen pro Röhrchen sehr vielversprechend. Sehr interessant wäre auch die Durchführung einer *in vivo* Quantifizierung von seneszenten NK-Zellen mittels β -Galactosidase *tracer* und die Analyse der Verteilung auf die verschiedenen Organe. Unsere durchflusszytometrische Analyse von NK-Zellen aus Milz und Lunge lieferten erste Hinweise darauf, dass seneszente NK-Zellen in manchen Organen vermehrt vorkommen bzw. stärker akkumulieren als in anderen.

Es ist bisher nicht geklärt, ab wann die in SLy1^{KO} NK-Zellen beobachtete ribosomale Instabilität auftritt. Arefanian et al. konnten zeigen, dass CD122⁺ NK-Vorläuferzellen im Knochenmark durch einen SLy1-Knockout nicht beeinträchtigt werden (Arefanian et al. 2016). Ein interessanter Ansatz wäre, die NK-Vorläuferzellen aus dem Knochenmark *in vitro* zu differenzieren und zu beobachten, ab wann eine ribosomale Instabilität, phänotypische Veränderungen und die Dysfunktion der NK-Zellen auftreten.

6

Zusammenfassung

Da NK-Zellen jederzeit, auch ohne vorherige Proliferation, bereit für eine Zytolyse von Zielzellen sein müssen, besitzen sie einen großen Pool an mRNA, der nach einer Aktivierung der Zelle unverzüglich in Granzym B und weitere Angriffsenzyme translatiert wird. Dafür benötigen NK-Zellen eine große Anzahl an Ribosomen, deren Stabilität durch Adaptorproteine wie SLy1 sichergestellt wird. In Abwesenheit von SLy1 kommt es zu ribosomaler Instabilität und damit einhergehend zur NK-Zell-Dysfunktion. Durch entstehende freie ribosomale Proteine wird der physiologische Abbau von p53 in SLy1^{KO} NK-Zellen verhindert. Die Akkumulation von p53 hat eine erhöhte Apoptoserate und ein schlechteres Überleben der Zellen zur Folge.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der NK-Zellen in der Lunge von SLy1^{KO} Mäusen verringert war. In der Lunge von SLy1^{KO}p53^{KO} Mäusen fanden sich jedoch normale NK-Zellzahlen, was die elementare Rolle von p53 in der Vermittlung dieser Defizienz belegt. Außerdem könnte ein SLy1-Knockout über die ribosomale Instabilität zu vermehrter NK-Zell *exhaustion* führen, welche sich in der vorliegenden Arbeit über eine verstärkte Expression von KLRG1 auf pulmonalen NK-Zellen zeigte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich in der Lunge und Milz von SLy1^{KO} Mäusen signifikant mehr NK-Zellen in Seneszenz befanden. Ein gleichzeitig vorliegender Knockout von p53 in NK-Zellen konnte die erhöhte Seneszenzrate nicht normalisieren. Die DDR Signalkaskade scheint, nach jetzigem Wissensstand, in der NK-Zell-Dysfunktion ebenfalls eine Rolle zu spielen; die Expression und Phosphorylierung von ATM/Chk2 und ATR/Chk1 war in SLy1^{KO} NK-Zellen tendenziell, jedoch nicht signifikant, erhöht. Ein SLy1-Knockout in NK-Zellen hatte keine Auswirkung auf den Anteil apoptotischer NK-Zellen in der Lunge und nur sehr geringe Auswirkungen auf die Expression von aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren auf pulmonalen NK-Zellen.

Die Signalwege, die in SLy1^{KO} NK-Zellen zur Auslösung von *exhaustion* und Seneszenz führen, sowie die funktionelle Auswirkung eines SLy1-Knockouts speziell auf pulmonale NK-Zellen sollten Gegenstand zukünftiger Studien sein. Nur ein möglichst lückenloses Wissen über NK-basierte Immunosurveillance, Tumorclearance und Infektabwehr ermöglicht die Entwicklung effizienter und zielgerichteter Therapien.

7

Literaturverzeichnis

- Ahn, Joon-Young, Xianghong Li, Heather L. Davis und Christine E. Canman (Mai 2002). „Phosphorylation of Threonine 68 Promotes Oligomerization and Autophosphorylation of the Chk2 Protein Kinase via the Forkhead-associated Domain“. In: *Journal of Biological Chemistry* 277.22, S. 19389–19395. DOI: 10.1074/jbc.m200822200.
- Alvarez, Maite, Federico Simonetta, Jeanette Baker, Antonio Pierini, Arielle S. Wenokur, Alyssa R. Morrison, William J. Murphy und Robert S. Negrin (Juli 2019). „Regulation of murine NK cell exhaustion through the activation of the DNA damage repair pathway“. In: *JCI Insight* 4.14. DOI: 10.1172/jci.insight.127729.
- Arefanian, Saeed, Daniel Schäll, Stephanie Chang, Reza Ghasemi, Ryuji Higashikubo, Alex Zheleznyak, Yizhan Guo, Jinsheng Yu, Hosseinali Asgharian, Wenjun Li, Andrew E. Gelman, Daniel Kreisel, Anthony R. French, Hani Zaher, Beatrice Plougastel-Douglas, Leonard Maggi, Wayne Yokoyama, Sandra Beer-Hammer und Alexander S. Krupnick (Sep. 2016). „Deficiency of the adaptor protein SLy1 results in a natural killer cell ribosomopathy affecting tumor clearance“. In: *OncoImmunology* 5.12, e1238543. DOI: 10.1080/2162402x.2016.1238543.
- Astoul, Emmanuelle, Arian D. Laurence, Nick Totty, Sandra Beer, Denis R. Alexander und Doreen A. Cantrell (März 2003). „Approaches to Define Antigen Receptor-induced Serine Kinase Signal Transduction Pathways“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.11, S. 9267–9275. DOI: 10.1074/jbc.m211252200.
- Aviv, Tzvi, Zhen Lin, Stefanie Lau, Laura M. Rendl, Frank Sicheri und Craig A. Smibert (Juli 2003). „The RNA-binding SAM domain of Smaug defines a new family of post-transcriptional regulators“. In: *Nature Structural & Molecular Biology* 10.8, S. 614–621. DOI: 10.1038/nsb956.
- Banin, S., L. Moyal, S.-Y. Shieh, Y. Taya, C. W. Anderson, L. Chessa, N. I. Smorodinsky, C. Prives, Y. Reiss, Y. Shiloh und Y. Ziv (Sep. 1998). „Enhanced Phosphorylation of p53 by ATM in Response to DNA Damage“. In: *Science* 281.5383, S. 1674–1677. DOI: 10.1126/science.281.5383.1674.
- Beer, Sandra, Tanja Scheickl, Bernhard Reis, Norbert Hüser, Klaus Pfeffer und Bernhard Holzmann (Nov. 2005). „Impaired Immune Responses and Prolonged Allograft Survival

- in Sly1 Mutant Mice“. In: *Molecular and Cellular Biology* 25.21, S. 9646–9660. DOI: 10.1128/mcb.25.21.9646-9660.2005.
- Beer, Sandra, Almut B. Simins, Anja Schuster und Bernhard Holzmann (Juli 2001). „Molecular cloning and characterization of a novel SH3 protein (SLY) preferentially expressed in lymphoid cells“. In: *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1520.1, S. 89–93. DOI: 10.1016/s0167-4781(01)00242-1.
- Beli, Eleni, David M. Duriancik, Jonathan F. Clinthorne, Taehyung Lee, Sungjin Kim und Elizabeth M. Gardner (Jan. 2014). „Natural killer cell development and maturation in aged mice“. In: *Mechanisms of Ageing and Development* 135, S. 33–40. DOI: 10.1016/j.mad.2013.11.007.
- Ben-Porath, Ittai und Robert A. Weinberg (Jan. 2004). „When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence“. In: *Journal of Clinical Investigation* 113.1, S. 8–13. DOI: 10.1172/jci200420663.
- Blumendeller, Carolin (2022). „Analysis of p53-mediated dysfunction of SLy1-deficient NK cells“. Dissertation. Eberhard-Karls Universität Tübingen.
- Breimer, L.H. (Jan. 1988). „Ionizing radiation-induced mutagenesis“. In: *British Journal of Cancer* 57.1, S. 6–18. DOI: 10.1038/bjc.1988.2.
- Bryceson, Yen-an T., Michael E. March, Hans-Gustaf Ljunggren und Eric O. Long (Jan. 2006). „Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion“. In: *Blood* 107.1, S. 159–166. DOI: 10.1182/blood-2005-04-1351.
- Cahu, Julie und Brigitte Sola (Aug. 2013). „A Sensitive Method to Quantify Senescent Cancer Cells“. In: *Journal of Visualized Experiments* 78. DOI: 10.3791/50494.
- Chao, Connie, Manfred Hergenhausen, Matthias D. Kaeser, Zhiqun Wu, Shin'ichi Saito, Richard Iggo, Monica Hollstein, Ettore Appella und Yang Xu (Aug. 2003). „Cell Type- and Promoter-specific Roles of Ser18 Phosphorylation in Regulating p53 Responses“. In: *Journal of Biological Chemistry* 278.42, S. 41028–41033. DOI: 10.1074/jbc.m306938200.
- Chen, Lihong, Daniele M Gilkes, Yu Pan, William S Lane und Jiandong Chen (Sep. 2005). „ATM and Chk2-dependent phosphorylation of MDMX contribute to p53 activation after DNA damage“. In: *The EMBO Journal* 24.19, S. 3411–3422. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600812.
- Cong, Jingjing, Xianwei Wang, Xiaohu Zheng, Dong Wang, Binqing Fu, Rui Sun, Zhigang Tian und Haiming Wei (Aug. 2018). „Dysfunction of Natural Killer Cells by FBP1-Induced Inhibition of Glycolysis during Lung Cancer Progression“. In: *Cell Metabolism* 28.2, 243–255.e5. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.06.021.

- Culley, Fiona J. (Okt. 2009). „Natural killer cells in infection and inflammation of the lung“. In: *Immunology* 128.2, S. 151–163. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03167.x.
- Cyster, Jason G. (Apr. 2005). „Chemokines, Sphingosine-1-Phosphate, and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs“. In: *Annual Review of Immunology* 23.1, S. 127–159. DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115628.
- Darzynkiewicz, Zbigniew, Elzbieta Bedner und Piotr Smolewski (Apr. 2001). „Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis“. In: *Seminars in Hematology* 38.2, S. 179–193. DOI: 10.1016/s0037-1963(01)90051-4.
- Debacq-Chainiaux, Florence, Jorge D. Erusalimsky, Judith Campisi und Olivier Toussaint (2009). „Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA- β gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo“. In: *Nature protocols* 4.12, S. 1798.
- Delmonte, Ottavia M., Jenna R. E. Bergerson, Tomoki Kawai, Hye Sun Kuehn, David H. McDermott, Irene Cortese, Michael T. Zimmermann, A. Kerry Dobbs, Marita Bosticardo, Danielle Fink, Shamik Majumdar, Boaz Palterer, Francesca Pala, Nikita R. Dsouza, Marie Pouzolles, Naomi Taylor, Katherine R. Calvo, Stephen R. Daley, Daniel Velez, Anahita Agharahimi, Katherine Myint-Hpu, Lesia K. Dropulic, Jonathan J. Lyons, Steven M. Holland, Alexandra F. Freeman, Rajarshi Ghosh, Morgan B. Similuk, Julie E. Niemela, Jennifer Stoddard, Douglas B. Kuhns, Raul Urrutia, Sergio D. Rosenzweig, Magdalena A. Walkiewicz, Philip M. Murphy und Luigi D. Notarangelo (Apr. 2021). „SASH3 variants cause a novel form of X-linked combined immunodeficiency with immune dysregulation“. In: *Blood* 138.12, S. 1019–1033. DOI: 10.1182/blood.2020008629.
- Derre, Laurent, Murielle Corvaisier, Marie-Christine Pandolfino, Elisabeth Diez, Francine Jotereau und Nadine Gervois (Mai 2002). „Expression of CD94/NKG2-A on Human T Lymphocytes Is Induced by IL-12: Implications for Adoptive Immunotherapy“. In: *The Journal of Immunology* 168.10, S. 4864–4870. DOI: 10.4049/jimmunol.168.10.4864.
- Eckelhart, Eva, Wolfgang Warsch, Eva Zebedin, Olivia Simma, Dagmar Stoiber, Thomas Kolbe, Thomas Rüllicke, Mathias Mueller, Emilio Casanova und Veronika Sexl (Feb. 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.
- Eisele, Günter, Jörg Wischhusen, Michel Mittelbronn, Richard Meyermann, Inja Waldhauer, Alexander Steinle, Michael Weller und Manuel A. Friese (Sep. 2006). „TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells“. In: *Brain* 129.9, S. 2416–2425. DOI: 10.1093/brain/awl205.
- Erdmann, Friederike, Claudia Spix und Alexander Katalinic (2021). „Krebs in Deutschland für 2017/2018“. In: 13. Ausgabe von Krebs in Deutschland, Robert Koch-Institut (Hrsg)

- und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). DOI: 10.25646/8353.
- Fehniger, Todd A., Sheng F. Cai, Xuefang Cao, Andrew J. Bredemeyer, Rachel M. Presti, Anthony R. French und Timothy J. Ley (Juni 2007). „Acquisition of Murine NK Cell Cytotoxicity Requires the Translation of a Pre-existing Pool of Granzyme B and Perforin mRNAs“. In: *Immunity* 26.6, S. 798–811. DOI: 10.1016/j.immuni.2007.04.010.
- Fogel, Leslie A., Michel M. Sun, Theresa L. Geurs, Leonidas N. Carayannopoulos und Anthony R. French (Mai 2013). „Markers of Nonselective and Specific NK Cell Activation“. In: *The Journal of Immunology* 190.12, S. 6269–6276. DOI: 10.4049/jimmunol.1202533.
- Fregoso, Oliver I., Shipra Das, Martin Akerman und Adrian R. Krainer (Apr. 2013). „Splicing-Factor Oncoprotein SRSF1 Stabilizes p53 via RPL5 and Induces Cellular Senescence“. In: *Molecular Cell* 50.1, S. 56–66. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.02.001.
- Ge, Ning, Yasuhiko Nishioka, Yoichi Nakamura, Yoshio Okano, Kazuo Yoneda, Hirohisa Ogawa, Akemi Sugita, Hiroaki Yanagawa und Saburo Sone (2004). „Synthesis and Secretion of Interleukin-15 by Freshly Isolated Human Bronchial Epithelial Cells“. In: *International Archives of Allergy and Immunology* 135.3, S. 235–242. DOI: 10.1159/000081309.
- Gill, Saar, Adrienne E. Vasey, Alysha De Souza, Jeanette Baker, Aaron T. Smith, Holbrook E. Kohrt, Mareike Florek, Kenneth D. Gibbs, Keri Tate, David S. Ritchie und Robert S. Negrin (Juni 2012). „Rapid development of exhaustion and down-regulation of eomesodermin limit the antitumor activity of adoptively transferred murine natural killer cells“. In: *Blood* 119.24, S. 5758–5768. DOI: 10.1182/blood-2012-03-415364.
- Gordon, Scott M., Julie Chaix, Levi J. Rupp, Junmin Wu, Sharline Madera, Joseph C. Sun, Tullia Lindsten und Steven L. Reiner (Jan. 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.
- Grégoire, Claude, Lionel Chasson, Carmelo Luci, Elena Tomasello, Frédéric Geissmann, Eric Vivier und Thierry Walzer (Dez. 2007). „The trafficking of natural killer cells“. In: *Immunological Reviews* 220.1, S. 169–182. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2007.00563.x.
- Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp und T. Spies (Okt. 1996). „Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.“ In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93.22, S. 12445–12450. DOI: 10.1073/pnas.93.22.12445.

- Gruber, Lena (2021). „Molekulare Analyse der Rolle von SLY1 im p53-Signalweg“. Dissertation. Eberhard-Karls Universität Tübingen.
- Guerra, Nadia, Ying Xim Tan, Nathalie T. Joncker, Augustine Choy, Fermin Gallardo, Na Xiong, Susan Knoblauch, Dragana Cado, Norman R. Greenberg und David H. Raulet (Apr. 2008). „NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy“. In: *Immunity* 28.4, S. 571–580. DOI: 10.1016/j.immuni.2008.02.016.
- Hanke, Thomas, Hisao Takizawa, Christopher W. McMahon, Dirk H. Busch, Eric G. Pamer, Joseph D. Miller, John D. Altman, Yang Liu, Dragana Cado, Francois A. Lemonnier, Pamela J. Bjorkman und David H. Raulet (Juli 1999). „Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors“. In: *Immunity* 11.1, S. 67–77. DOI: 10.1016/s1074-7613(00)80082-5.
- Harley, Calvin B., A. Bruce Futcher und Carol W. Greider (Mai 1990). „Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts“. In: *Nature* 345.6274, S. 458–460. DOI: 10.1038/345458a0.
- Hayakawa, Yoshihiro und Mark J. Smyth (Jan. 2006). „CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity“. In: *The Journal of Immunology* 176.3, S. 1517–1524. DOI: 10.4049/jimmunol.176.3.1517.
- Hayflick, L. (März 1965). „The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains“. In: *Experimental Cell Research* 37.3, S. 614–636. DOI: 10.1016/0014-4827(65)90211-9.
- Hervier, Baptiste, Jules Russick, Isabelle Cremer und Vincent Vieillard (Juni 2019). „NK Cells in the Human Lungs“. In: *Frontiers in Immunology* 10. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01263.
- Hirao, Atsushi, Young-Yun Kong, Shuhei Matsuoka, Andrew Wakeham, Jürgen Ruland, Hiroki Yoshida, Dou Liu, Stephen J. Elledge und Tak W. Mak (März 2000). „DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2“. In: *Science* 287.5459, S. 1824–1827. DOI: 10.1126/science.287.5459.1824.
- Huntington, Nicholas D., Hy Tabarias, Kirsten Fairfax, Jason Brady, Yoshihiro Hayakawa, Mariapia A. Degli-Esposti, Mark J. Smyth, David M. Tarlinton und Stephen L. Nutt (Apr. 2007). „NK Cell Maturation and Peripheral Homeostasis Is Associated with KLRG1 Up-Regulation“. In: *The Journal of Immunology* 178.8, S. 4764–4770. DOI: 10.4049/jimmunol.178.8.4764.
- Imai, Kazue, Satoru Matsuyama, Satoshi Miyake, Kenji Suga und Kei Nakachi (Nov. 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.

- Ito, Masayuki, Takuma Maruyama, Naotoshi Saito, Satoru Koganei, Kazuo Yamamoto und Naoki Matsumoto (Feb. 2006). „Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity“. In: *Journal of Experimental Medicine* 203.2, S. 289–295. DOI: 10.1084/jem.20051986.
- Jeggo, Penny und Markus Löbrich (Dez. 2006). „Radiation-induced DNA damage responses“. In: *Radiation Protection Dosimetry* 122.1-4, S. 124–127. DOI: 10.1093/rpd/nc1495.
- Judge, Sean J., William J. Murphy und Robert J. Canter (Feb. 2020). „Characterizing the Dysfunctional NK Cell: Assessing the Clinical Relevance of Exhaustion, Anergy, and Senescence“. In: *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10. DOI: 10.3389/fcimb.2020.00049.
- Karimi, Khalil und Paul Forsythe (2013). „Natural killer cells in asthma“. In: *Frontiers in Immunology* 4. DOI: 10.3389/fimmu.2013.00159.
- Kraft, Maren Monique (2022). „Molekulare Analyse der Rolle von Sly1 bei der Thymozyten Proliferation und Differenzierung“. Dissertation. Eberhard-Karls Universität Tübingen.
- Kreisel, Daniel, Andrew E. Gelman, Ryuji Higashikubo, Xue Lin, Haris G. Vikis, J. Michael White, Kelsey A. Toth, Charuhas Deshpande, Beatriz M. Carreno, Ming You, Samantha M. Taffner, Wayne M. Yokoyama, Jack D. Bui, Robert D. Schreiber und Alexander S. Krupnick (Juni 2012). „Strain-specific variation in murine natural killer gene complex contributes to differences in immunosurveillance for urethane-induced lung cancer“. In: *Cancer Research* 72.17, S. 4311–4317. DOI: 10.1158/0008-5472.can-12-0908.
- Krusch, Matthias, Julia Salih, Ingrid Kumbier, Carolin Fenner, Lothar Kanz und Helmut R. Salih (Nov. 2009). „The Role of the PI3K-AKT-mTOR Pathway in NK Cell Anti-Tumor Reactivity.“ In: *Blood* 114.22, S. 3690–3690. DOI: 10.1182/blood.v114.22.3690.3690.
- Lee, Chang-Woo und Nicholas B. La Thangue (Juli 1999). „Promoter specificity and stability control of the p53-related protein p73“. In: *Oncogene* 18.29, S. 4171–4181. DOI: 10.1038/sj.onc.1202793.
- Liu, Shizhou, Bunsyo Shiotani, Mayurika Lahiri, Alexandre Maréchal, Alice Tse, Charles Chung Yun Leung, J.N. Mark Glover, Xiaohong H. Yang und Lee Zou (Juli 2011). „ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation“. In: 43.2, S. 192–202. DOI: 10.1016/j.molcel.2011.06.019.
- Liu, Yen-Chun, Feng Li, Jesse Handler, Cheng Ran Lisa Huang, Yan Xiang, Nicola Neretti, John M. Sedivy, Karen I. Zeller und Chi V. Dang (Juli 2008). „Global Regulation of Nucleotide Biosynthetic Genes by c-Myc“. In: *PLoS ONE* 3.7. Hrsg. von Dong-Yan Jin, e2722. DOI: 10.1371/journal.pone.0002722.

- Lopez-Vergès, Sandra, Jeffrey M. Milush, Suchitra Pandey, Vanessa A. York, Janice Arakawa-Hoyt, Hanspeter Pircher, Philip J. Norris, Douglas F. Nixon und Lewis L. Lanier (Nov. 2010). „CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset“. In: *Blood* 116.19, S. 3865–3874. DOI: 10.1182/blood-2010-04-282301.
- Ma, Hanhui und Thoru Pederson (Mai 2013). „The nucleolus stress response is coupled to an ATR-Chk1-mediated G2 arrest“. In: *Molecular Biology of the Cell* 24.9. Hrsg. von Mark J. Solomon, S. 1334–1342. DOI: 10.1091/mbc.e12-12-0881.
- Marquardt, Nicole, Vivien Béziat, Sanna Nyström, Julia Hengst, Martin A. Ivarsson, Eliisa Kekäläinen, Helene Johansson, Jenny Mjösberg, Magnus Westgren, Tim O. Lankisch, Heiner Wedemeyer, Ewa C. Ellis, Hans-Gustaf Ljunggren, Jakob Michaëlsson und Niklas K. Björkström (Feb. 2015). „Cutting Edge: Identification and Characterization of Human Intrahepatic CD49a+ NK Cells“. In: *The Journal of Immunology* 194.6, S. 2467–2471. DOI: 10.4049/jimmunol.1402756.
- Marquardt, Nicole, Eliisa Kekäläinen, Puran Chen, Egle Kvedaraite, Jennifer N. Wilson, Martin A. Ivarsson, Jenny Mjösberg, Lena Berglin, Jesper Säfholm, Martijn L. Manson, Mikael Adner, Mamdoh Al-Ameri, Per Bergman, Ann-Charlotte Orre, Mattias Svensson, Barbro Dahlén, Sven-Erik Dahlén, Hans-Gustaf Ljunggren und Jakob Michaëlsson (Apr. 2017). „Human lung natural killer cells are predominantly comprised of highly differentiated hypofunctional CD69 - CD56 dim cells“. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 139.4, 1321–1330.e4. DOI: 10.1016/j.jaci.2016.07.043.
- McGowan, Kelly A., Jun Z. Li, Christopher Y. Park, Veronica Beaudry, Holly K. Tabor, Amit J. Sabnis, Weibin Zhang, Helmut Fuchs, Martin Hrabé de Angelis, Richard M. Myers, Laura D. Attardi und Gregory S. Barsh (Juli 2008). „Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects“. In: *Nature Genetics* 40.8, S. 963–970. DOI: 10.1038/ng.188.
- Melis, Lode, Liesbet Van Praet, Hanspeter Pircher, Koen Venken und Dirk Elewaut (Juni 2013). „Senescence marker killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) contributes to TNF- α production by interaction with its soluble E-cadherin ligand in chronically inflamed joints“. In: *Annals of the Rheumatic Diseases* 73.6, S. 1223–1231. DOI: 10.1136/annrheumdis-2013-203881.
- Michel, Tatiana, Aurélie Poli, Olivia Domingues, Marion Mauffray, Maud Thérésine, Nicolaas H. C. Brons, François Hentges und Jacques Zimmer (Dez. 2012). „Mouse Lung and Spleen Natural Killer Cells Have Phenotypic and Functional Differences, in Part Influenced by Macrophages“. In: *PLoS ONE* 7.12. Hrsg. von Vassiliki A. Boussiotis, e51230. DOI: 10.1371/journal.pone.0051230.

- Nguyen, Uyen, Nick Squaglia, Annegret Boge und Peter A Fung (Okt. 2011). „The Simple Western™: a gel-free, blot-free, hands-free Western blotting reinvention“. In: *Nature Methods* 8.11, S. v–vi. DOI: 10.1038/nmeth.f.353.
- O’Sullivan, Timothy E., Joseph C. Sun und Lewis L. Lanier (Okt. 2015). „Natural Killer Cell Memory“. In: *Immunity* 43.4, S. 634–645. DOI: 10.1016/j.immuni.2015.09.013.
- Pederson, Thoru (Nov. 2010). „The Nucleolus“. In: *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3.3, a000638–a000638. DOI: 10.1101/cshperspect.a000638.
- Pegram, Hollie J., Daniel M. Andrews, Mark J. Smyth, Phillip K. Darcy und Michael H. Kershaw (Juni 2010). „Activating and inhibitory receptors of natural killer cells“. In: *Immunology & Cell Biology* 89.2, S. 216–224. DOI: 10.1038/icb.2010.78.
- Pelletier, Joffrey, Ferran Riaño-Canalias, Eugènia Almacellas, Caroline Mauvezin, Sara Samino, Sonia Feu, Sandra Menoyo, Ana Domostegui, Marta Garcia-Cajide, Ramon Salazar, Constanza Cortés, Ricard Marcos, Albert Tauler, Oscar Yanes, Neus Agell, Sara C. Kozma, Antonio Gentilella und George Thomas (Juni 2020). „Nucleotide depletion reveals the impaired ribosome biogenesis checkpoint as a barrier against DNA damage“. In: *The EMBO Journal* 39.13. DOI: 10.15252/embj.2019103838.
- Pelletier, Joffrey, George Thomas und Siniša Volarević (Dez. 2017). „Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues“. In: *Nature Reviews Cancer* 18.1, S. 51–63. DOI: 10.1038/nrc.2017.104.
- Pessino, Anna, Simona Sivori, Cristina Bottino, Angela Malaspina, Luigia Morelli, Lorenzo Moretta, Roberto Biassoni und Alessandro Moretta (Sep. 1998). „Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity“. In: *Journal of Experimental Medicine* 188.5, S. 953–960. DOI: 10.1084/jem.188.5.953.
- Reis, Bernhard, Klaus Pfeffer und Sandra Beer-Hammer (Feb. 2009). „The orphan adapter protein SLY1 as a novel anti-apoptotic protein required for thymocyte development“. In: *BMC immunology* 10, S. 38. DOI: 10.1186/1471-2172-10-38.
- Robbins, Scott H., Khuong B. Nguyen, Nobuaki Takahashi, Toshifumi Mikayama, Christine A. Biron und Laurent Brossay (März 2002). „Cutting edge: inhibitory functions of the killer cell lectin-like receptor G1 molecule during the activation of mouse NK cells“. In: *The Journal of Immunology* 168.6, S. 2585–2589. DOI: 10.4049/jimmunol.168.6.2585.
- Robinson, B. W., P. Pinkston und R. G. Crystal (Sep. 1984). „Natural killer cells are present in the normal human lung but are functionally impotent.“ In: *Journal of Clinical Investigation* 74.3, S. 942–950. DOI: 10.1172/jci111513.

- Schneider, Barbara (2021). „Molekulare Analyse der Rolle von SLy1 in der T-Zell-Entwicklung“. Dissertation. Eberhard-Karls Universität Tübingen.
- Schwenck, Johannes, J. Cotton, B. Zhou, K. Wolter, A. Kuehn, K. Fuchs, A. Maurer, M. Krueger, C. la Fougère, L. Zender und B. J. Pichler (März 2019). „In Vivo Imaging of Tumor Senescence with a novel beta-Galactosidase specific PET Tracer“. In: *Nuklearmedizin* 2019, Georg Thieme Verlag KG. DOI: 10.1055/s-0039-1683474.
- Shi, Lei, Kang Li, Yizhan Guo, Anirban Banerjee, Qing Wang, Ulrike M. Lorenz, Mahmut Parlak, Lucy C. Sullivan, Oscar Okwudiri Onyema, Saeed Arefanian, Edward B. Stelow, David L. Brautigam, Timothy N. J. Bullock, Michael G. Brown und Alexander Sasha Krupnick (Okt. 2018). „Modulation of NKG2D, NKp46, and Ly49C/I facilitates natural killer cell-mediated control of lung cancer“. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115.46, S. 11808–11813. DOI: 10.1073/pnas.1804931115.
- Sloan, Katherine E., Markus T. Bohnsack und Nicholas J. Watkins (Okt. 2013). „The 5S RNP Couples p53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress“. In: *Cell Reports* 5.1, S. 237–247. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.049.
- Smith, Joanne, Lye Mun Tho, Naihan Xu und David A. Gillespie (2010). „The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer“. In: S. 73–112. DOI: 10.1016/b978-0-12-380888-2.00003-0.
- Streltsova, Maria A., Sofya A. Erokhina, Leonid M. Kanevskiy, Dean A. Lee, William G. Telford, Alexander M. Sapozhnikov und Elena I. Kovalenko (Dez. 2018). „Analysis of NK cell clones obtained using interleukin-2 and gene-modified K562 cells revealed the ability of “senescent” NK cells to lose CD57 expression and start expressing NKG2A“. In: *PLOS ONE* 13.12. Hrsg. von Niklas K. Björkström, e0208469. DOI: 10.1371/journal.pone.0208469.
- Suen, Wade Chun-Wai, Wayne Yuk-Wai Lee, Kam-Tong Leung, Xiao-Hua Pan und Gang Li (Sep. 2018). „Natural Killer Cell-Based Cancer Immunotherapy: A Review on 10 Years Completed Clinical Trials“. In: *Cancer Investigation* 36.8, S. 431–457. DOI: 10.1080/07357907.2018.1515315.
- Sulli, Gabriele, Raffaella Di Micco und Fabrizio d’Adda di Fagagna (Sep. 2012). „Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer“. In: *Nature Reviews Cancer* 12.10, S. 709–720. DOI: 10.1038/nrc3344.
- Tomasello, Elena, Mathieu Blery, Eric Vely und Eric Vivier (Apr. 2000). „Signaling pathways engaged by NK cell receptors: double concerto for activating receptors, inhibitory receptors and NK cells“. In: *Seminars in Immunology* 12.2, S. 139–147. DOI: 10.1006/smim.2000.0216.
- Tomasello, Elena, Nadia Yessaad, Emilie Gregoire, Kelly Hudspeth, Carmelo Luci, Domenico Mavilio, Jean Hardwigen und Eric Vivier (2012). „Mapping of NKp46+ Cells in

- Healthy Human Lymphoid and Non-Lymphoid Tissues“. In: *Frontiers in Immunology* 3. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00344.
- van der Meer, Freek J., Dirk J. Faber, Maurice C. G. Aalders, Andre A. Poot, Istvan Vermes und Ton G. van Leeuwen (Sep. 2009). „Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography“. In: *Lasers in Medical Science* 25.2, S. 259–267. DOI: 10.1007/s10103-009-0723-y.
- Vance, Russell E., Jennifer R. Kraft, John D. Altman, Peter E. Jensen und David H. Raulet (Nov. 1998). „Mouse CD94/NKG2A Is a Natural Killer Cell Receptor for the Nonclassical Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I Molecule Qa-1b“. In: *Journal of Experimental Medicine* 188.10, S. 1841–1848. DOI: 10.1084/jem.188.10.1841.
- Wang, Jian, Fengqi Li, Meijuan Zheng, Rui Sun, Haiming Wei und Zhigang Tian (Aug. 2012). „Lung natural killer cells in mice: phenotype and response to respiratory infection“. In: *Immunology* 137.1, S. 37–47. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2012.03607.x.
- Wu, Chuanfeng, Diego A. Espinoza, Samson J. Koelle, Di Yang, Lauren Truitt, Heinrich Schlums, Bernard A. Lafont, Jan K. Davidson-Moncada, Rong Lu, Amitinder Kaur, Quirin Hammer, Brian Li, Sandhya Panch, David A. Allan, Robert E. Donahue, Richard W. Childs, Chiara Romagnani, Yen-an T. Bryceson und Cynthia E. Dunbar (Nov. 2018). „Clonal expansion and compartmentalized maintenance of rhesus macaque NK cell subsets“. In: *Science Immunology* 3.29. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat9781.
- Wu, Jun, Yaoli Song, Alexander B. H. Bakker, Stefan Bauer, Thomas Spies, Lewis L. Lanier und Joseph H. Phillips (Juli 1999). „An Activating Immunoreceptor Complex Formed by NKG2D and DAP10“. In: *Science* 285.5428, S. 730–732. DOI: 10.1126/science.285.5428.730.
- Yokoyama, Wayne M. und Sungjin Kim (Dez. 2006). „Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I“. In: *Immunological Reviews* 214.1, S. 143–154. DOI: 10.1111/j.1600-065x.2006.00458.x.
- Yokoyama, Wayne M., Sungjin Kim und Anthony R. French (Apr. 2004). „The Dynamic Life of Natural Killer Cells“. In: *Annual Review of Immunology* 22.1, S. 405–429. DOI: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104711.
- Zhao, Hong, Frank Traganos und Zbigniew Darzynkiewicz (2009). „Kinetics of the UV-induced DNA damage response in relation to cell cycle phase. Correlation with DNA replication“. In: *Cytometry Part A*, n/a–n/a. DOI: 10.1002/cyto.a.20839.
- Zhou, Binhua P., Yong Liao, Weiya Xia, Yiyu Zou, Bill Spohn und Mien-Chie Hung (Okt. 2001). „HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation“. In: *Nature Cell Biology* 3.11, S. 973–982. DOI: 10.1038/ncb1101-973.

8

Anhang

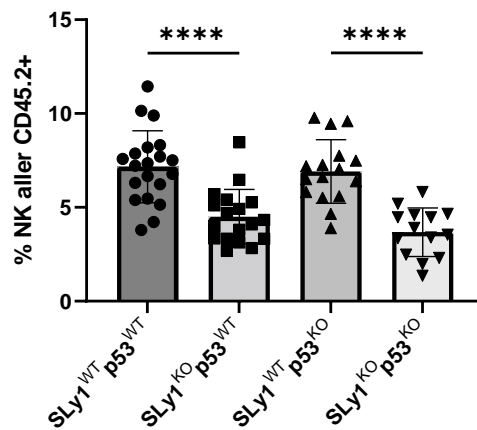


Abbildung 38. Prozentualer Anteil der NK-Zellen aller Leukozyten in der Lunge

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil der NK-Zellen aller CD45.2⁺ Zellen in der Lunge von Mäusen der angegebenen Genotypen. Die Quantifizierung erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD, SLy1^{WT}p53^{WT}: n=20, SLy1^{KO}p53^{WT}: n=19, SLy1^{WT}p53^{KO}: n=16, SLy1^{KO}p53^{KO}: n=14. (****: p < 0,0001; Student's t-test)

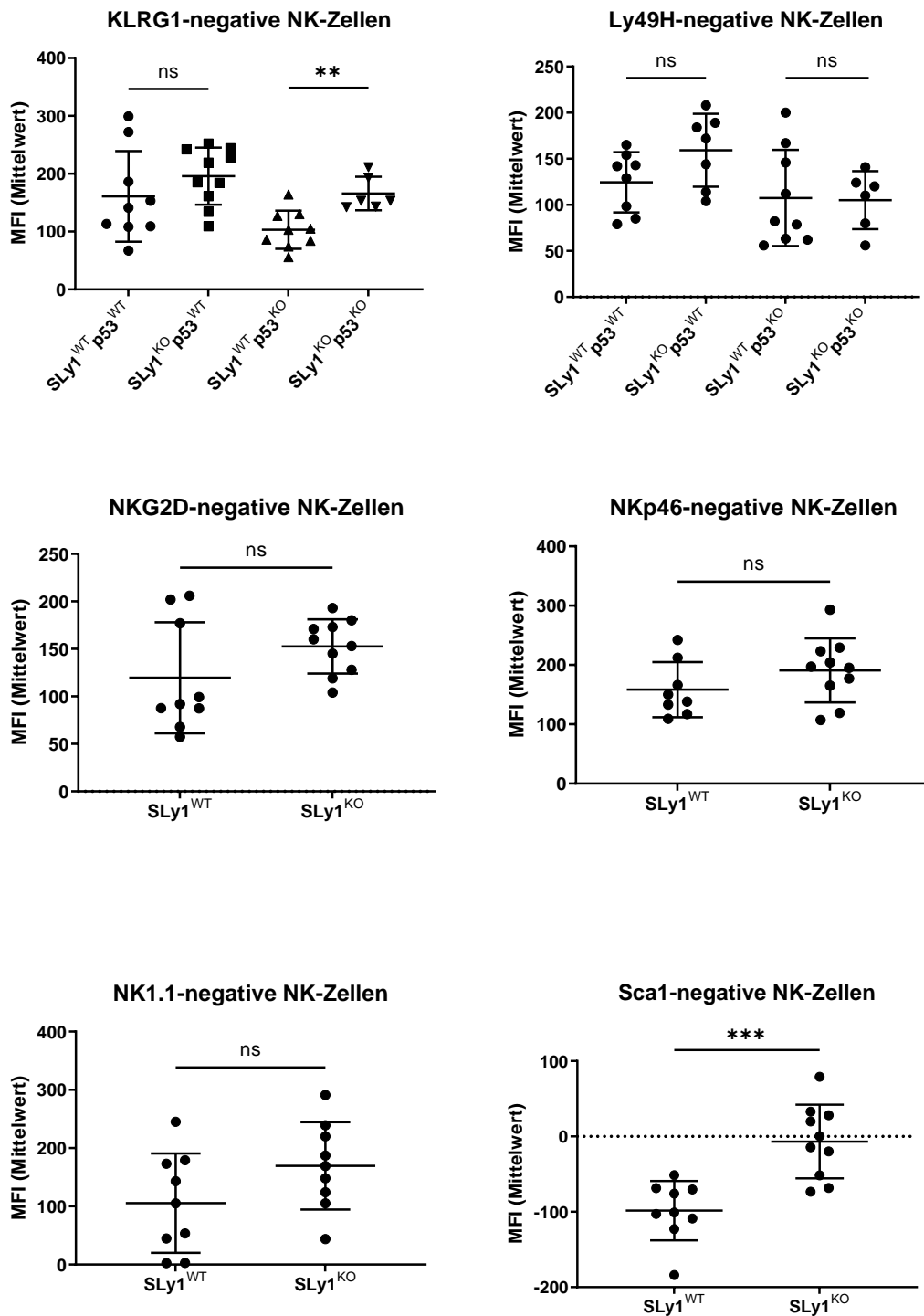


Abbildung 39. MFI PE⁻ pulmonaler NK-Zellen

Die Abbildung zeigt die MFI Werte der PE⁻ Referenzpopulation. Es handelt sich um pulmonale NK-Zellen, die den jeweiligen Oberflächenmarker nicht exprimieren. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD. (*: $p < 0,1$; Student's t-test)

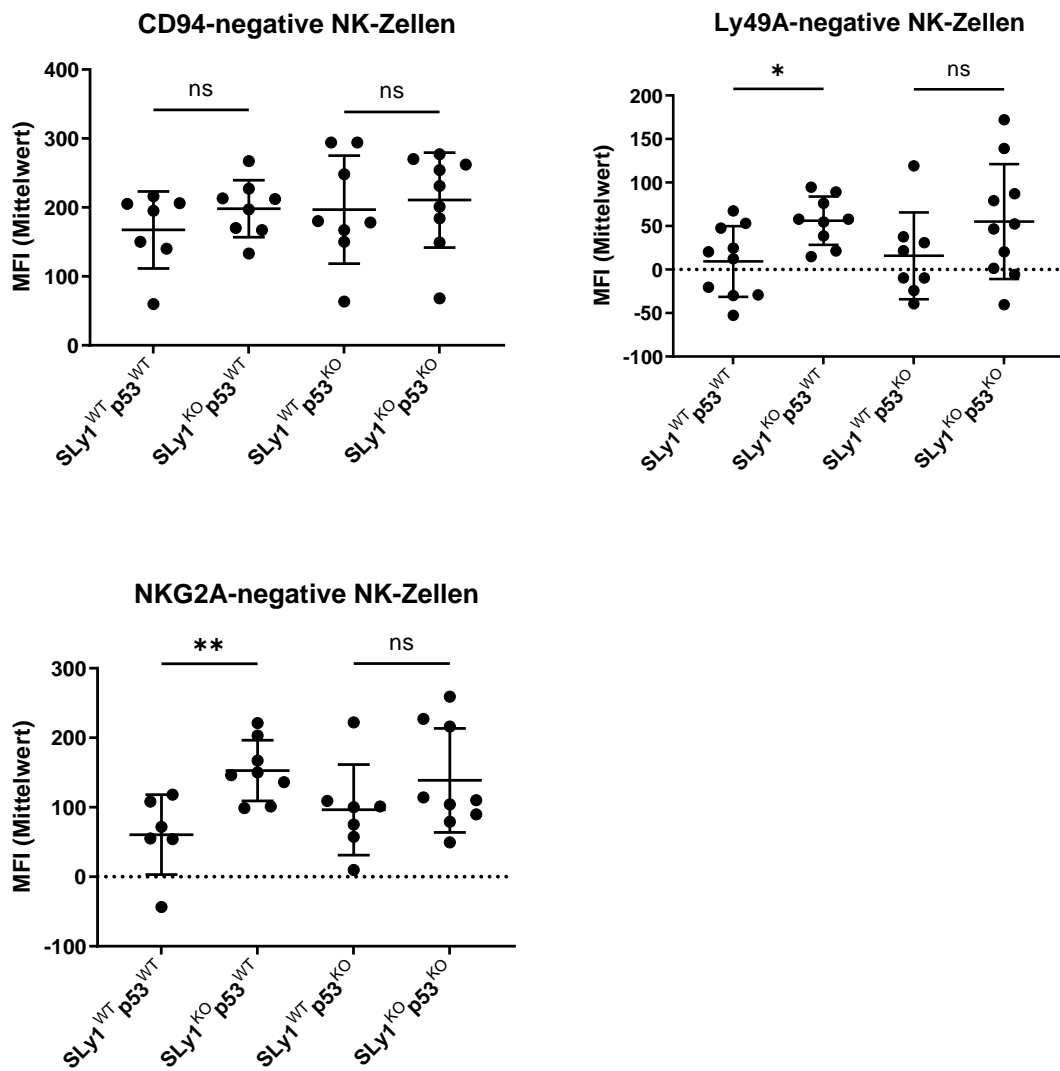


Abbildung 40. MFI PE⁻ pulmonaler NK-Zellen

Die Abbildung zeigt die MFI Werte der PE⁻ Referenzpopulation. Es handelt sich um pulmonale NK-Zellen, die den jeweiligen Oberflächenmarker nicht exprimieren. Die Quantifizierung erfolgte durchflusszytometrisch. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD. (*: $p < 0,1$; Student's t-test)

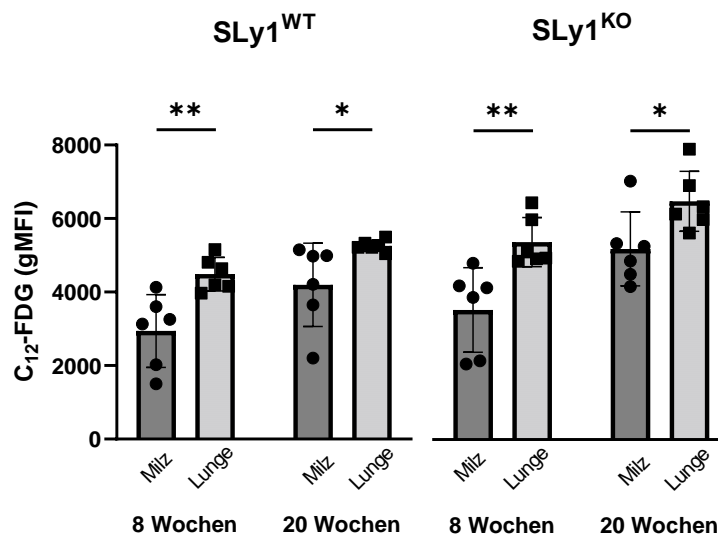


Abbildung 41. Vergleich der Seneszenzrate in Milz und Lunge.

Die Abbildung zeigt den Anteil seneszenten (C₁₂FDG⁺) NK-Zellen in der Milz und Lunge von Mäusen der angegebenen Genotypen und Altersgruppen. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD, jeweils n=6. (*: p < 0,1, **: p < 0,01; Student's t-test)

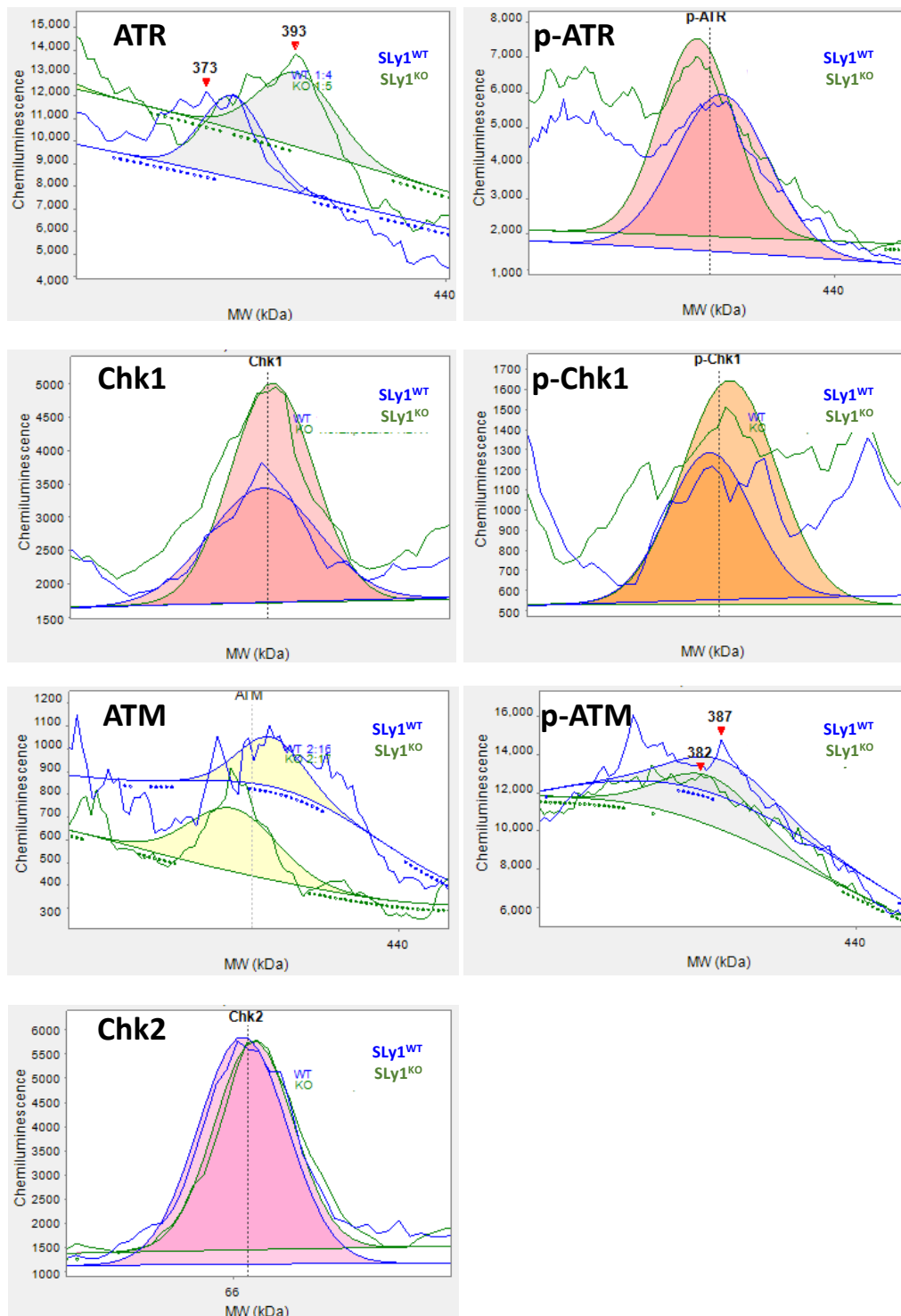


Abbildung 42. Repräsentative WES Chemilumineszenzdiagramme der Expression und Phosphorylierung von ATR, Chk1, ATM und Chk2 in NK-Zellen

Repräsentative Chemilumineszenzdiagramme von ATR und p-ATR, Chk1 und p-Chk1, ATM und p-ATM sowie Chk2. Zur Peakanalyse wurde mithilfe der Software *Compass for SW* eine Gaußsche Kurve an die Peaks angepasst und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Farben der *peakfits* werden vom Programm zufällig gewählt und haben keine Bedeutung.

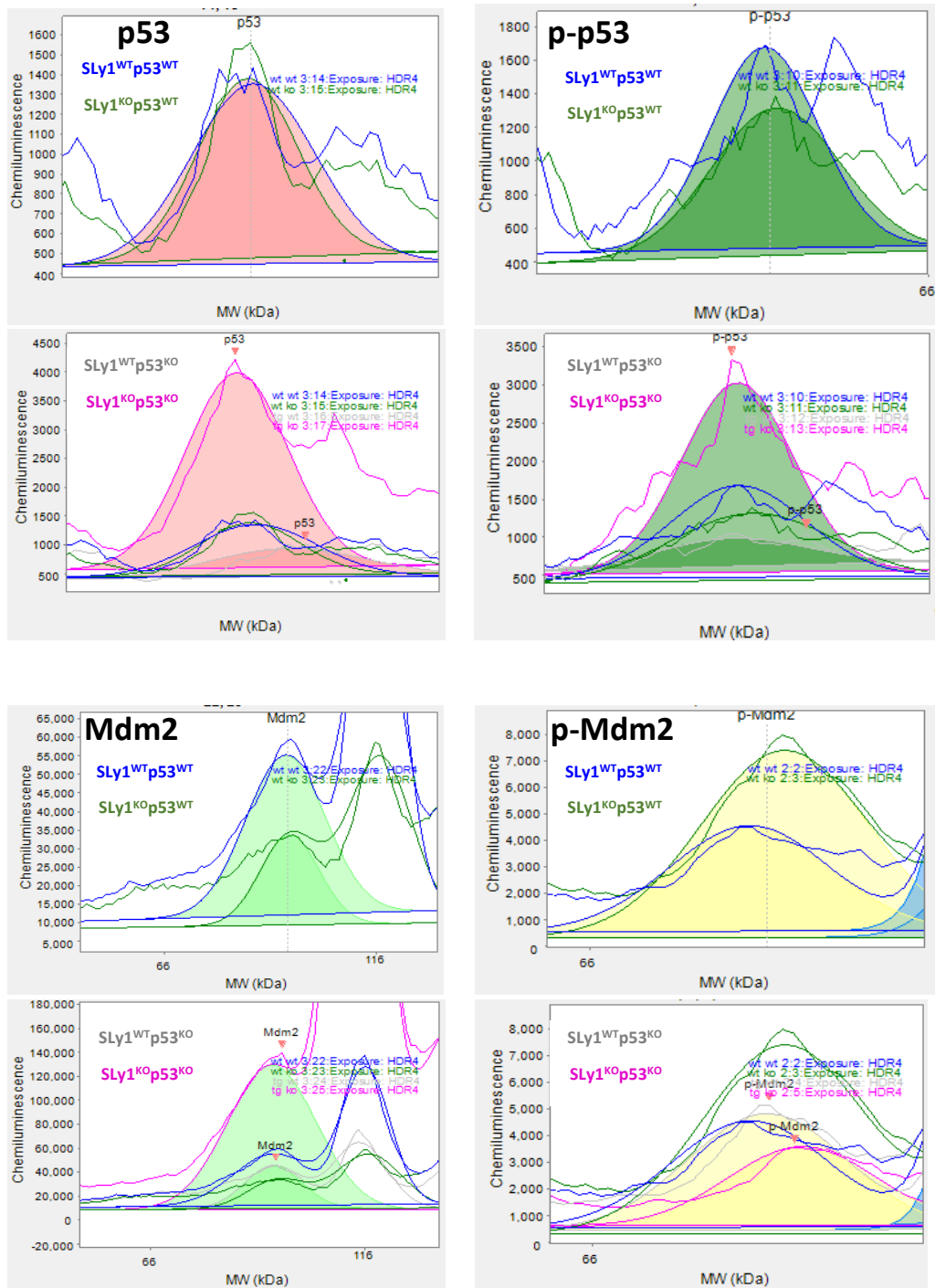


Abbildung 43. Repräsentative WES Chemilumineszenzdiagramme der Expression und Phosphorylierung von p53 und Mdm2 in NK-Zellen

Repräsentative Chemilumineszenzdiagramme von p53 und p-p53 bzw. Mdm2 und p-Mdm2. Zur Peakanalyse wurde mithilfe der Software *Compass for SW* eine Gaußsche Kurve an die Peaks angepasst und die Fläche unter der Kurve bestimmt. Die Farben der *peakfits* werden vom Programm zufällig gewählt und haben keine Bedeutung.

Tabelle 18. Expression und Phosphorylierung von DDR Proteinen in bestrahlten Thymozyten

Ergebnisse der Expressionsanalyse mittels klassischem Western Blot. p=Phospho-; Anz. = Anzahl der Versuche; KO/WT = SLy1^{KO}/SLy1^{WT}; jeweils MW \pm SD des adj. Volume, normiert auf β -Aktin.

	Unbestrahlt				0 h				2 h				4 h			
	Anz.	SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{KO}	KO/WT	Anz.	SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{KO}	KO/WT	Anz.	SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{KO}	KO/WT	Anz.	SLy1 ^{WT}	SLy1 ^{KO}	KO/WT
p-ATR	n=2	0,003 \pm 0,005	0,013 \pm 0,003	1,658 \pm 0,000	n=4	0,045 \pm 0,068	0,182 \pm 0,340	1,915 \pm 2,463	n=4	0,074 \pm 0,102	0,141 \pm 0,154	4,300 \pm 5,406	n=4	0,047 \pm 0,039	0,126 \pm 0,101	4,276 \pm 2,643
ATR	n=2	0,033 \pm 0,042	0,776 \pm 0,666	177,5 \pm 244,2	n=5	0,255 \pm 0,364	0,205 \pm 0,177	2,003 \pm 1,778	n=5	0,293 \pm 0,261	0,649 \pm 0,542	2,290 \pm 0,6367	n=5	0,499 \pm 0,652	0,857 \pm 1,791	1,290 \pm 1,147
p-Chk1	n=2	0,056 \pm 0,066	0,139 \pm 0,175	2,042 \pm 0,715	n=5	0,152 \pm 0,089	0,209 \pm 0,216	1,205 \pm 0,861	n=5	1,324 \pm 1,700	0,835 \pm 0,690	0,898 \pm 0,291	n=5	0,187 \pm 0,250	0,204 \pm 0,143	1,883 \pm 0,958
Chk1	n=2	0,689 \pm 0,349	0,907 \pm 0,327	1,647 \pm 1,309	n=5	0,910 \pm 1,089	0,724 \pm 0,539	1,509 \pm 1,126	n=5	1,019 \pm 0,857	1,137 \pm 0,941	1,083 \pm 0,234	n=5	0,554 \pm 0,375	0,819 \pm 1,045	1,311 \pm 0,767
p-ATM	n=2	0,546 \pm 0,624	1,622 \pm 0,843	5,935 \pm 5,222	n=5	1,041 \pm 0,545	2,368 \pm 1,520	2,242 \pm 0,979	n=5	1,048 \pm 1,074	1,233 \pm 1,164	1,624 \pm 0,767	n=5	0,417 \pm 0,474	0,638 \pm 0,711	2,439 \pm 2,048
ATM	n=2	0,339 \pm 0,101	1,987 \pm 0,677	5,827 \pm 0,270	n=5	0,752 \pm 0,666	1,000 \pm 1,058	1,311 \pm 0,951	n=5	1,020 \pm 0,934	0,884 \pm 0,804	0,955 \pm 0,576	n=5	0,822 \pm 0,656	1,209 \pm 1,630	0,984 \pm 0,974
p-Chk2	n=2	0,380 \pm 0,263	0,376 \pm 0,255	0,998 \pm 0,022	n=5	1,743 \pm 3,535	2,079 \pm 3,811	4,033 \pm 3,491	n=5	2,019 \pm 4,102	2,407 \pm 3,993	2,581 \pm 1,666	n=5	3,621 \pm 7,782	5,079 \pm 9,817	3,906 \pm 6,017
Chk2	n=2	0,193 \pm 0,153	0,255 \pm 0,026	1,848 \pm 1,324	n=5	0,171 \pm 0,197	0,229 \pm 0,148	1,898 \pm 0,742	n=5	0,140 \pm 0,173	0,178 \pm 0,209	1,854 \pm 1,384	n=5	0,078 \pm 0,124	0,063 \pm 0,051	1,666 \pm 0,915
p-p53	n=2	0,050 \pm 0,062	0,022 \pm 0,006	1,615 \pm 1,885	n=5	0,034 \pm 0,034	0,048 \pm 0,039	1,703 \pm 0,668	n=5	1,469 \pm 1,412	1,460 \pm 1,071	1,290 \pm 0,927	n=5	0,845 \pm 0,752	1,281 \pm 0,846	1,724 \pm 0,812
p53	n=2	0,014 \pm 0,000	0,024 \pm 0,009	1,696 \pm 0,651	n=5	0,032 \pm 0,030	0,058 \pm 0,095	2,405 \pm 2,866	n=5	0,444 \pm 0,615	0,492 \pm 0,591	1,235 \pm 0,305	n=5	0,332 \pm 0,508	0,497 \pm 0,691	1,981 \pm 1,103
p-Mdm2	n=2	1,488 \pm 0,773	1,726 \pm 1,337	1,072 \pm 0,342	n=5	1,549 \pm 1,464	1,383 \pm 1,236	2,035 \pm 2,067	n=5	0,635 \pm 0,782	0,710 \pm 0,728	1,559 \pm 1,036	n=5	0,134 \pm 0,153	0,273 \pm 0,339	2,170 \pm 0,866
Mdm2	n=2	0,160 \pm 0,099	0,064 \pm 0,073	0,666 \pm 0,865	n=5	0,301 \pm 0,237	0,319 \pm 0,330	1,001 \pm 0,649	n=5	0,362 \pm 0,324	0,329 \pm 0,400	1,933 \pm 1,869	n=5	0,095 \pm 0,066	0,072 \pm 0,054	1,526 \pm 1,587

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik unter Betreuung von Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer, stellvertretende Abteilungsleiterin der Abteilung Pharmakologie, Experimentelle Therapie und Toxikologie.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Labormitglieder (insbesondere Claudia Müller, Renate Riehle, Lena-Christin Gruber, Carolin Blumendeller) und Mitglieder befreundeter Labore (Anja Schmitt (IFIB – Interfakultäres Institut für Biochemie, AG Hailfinger), Dr. Yamel Cardona (Department of Immunology Tübingen, AG Weber)) von mir eigenständig durchgeführt. Killing Assays wurden mit Hilfe von Claudia Müller durchgeführt.

Die Bestimmung der Seneszenzrate mittels β -Galactosidase *tracer* erfolgte mit Hilfe von Dr. Marcel Krüger und Natalie Hermann am Werner Siemens Imaging Center.

Die Bestrahlung der Thymozyten erfolgte mit Hilfe von Prof. Dr. Mahmoud Toulany an der Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung.

Die Genotypisierung der Mäuse wurde von Claudia Müller, Derya Eliacik und Helen Kümmerle durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung durch das Institut für Biometrie durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 13. April 2023

[Victoria Eiperle]

Danksagung

Vielen Dank, Prof. Dr. Sandra Beer-Hammer, dass Du mir mit deiner Kreativität und deinem Forschungsgeist die Möglichkeit zu dieser Doktorarbeit gegeben hast. Danke für die inhaltliche und fachliche Hilfe, deine Unterstützung und dein allzeit offenes Ohr! Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Dr. Bernd Nürnberg für die Möglichkeit am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Pharmakogenomik promovieren zu dürfen.

Vielen Dank an das tolle Laborteam der AG Beer-Hammer, das mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Namentlich möchte ich mich bei Claudia Müller, Renate Riehle, Lena Gruber und Barbara Schneider bedanken. Danke an Carolin Blumendeller, die immer vor Motivation und Begeisterung sprüht. Danke Derya Eliacik und Helen Kümmerle für die Hilfe bei der Genotypisierung der Mäuse.

Ich möchte mich außerdem bei den Gruppenleitern und Mitarbeitern der befreundeten Arbeitsgruppen für die gelungene Zusammenarbeit bedanken. Namentlich geht mein Dank an Prof. Dr. Alex Weber, Prof. Dr. Oliver Planz, Dr. Yamel Cardona Gloria, Julia Koch-Heier, Dr. Marcel Krüger, Natalie Hermann, Prof. Dr. Mahmoud Toulany, Anja Schmitt und an Dr. You-Shan Feng.

Vielen Dank an die Verantwortlichen des IZKF Promotionskollegs, die mich nicht nur finanziell, sondern auch durch hervorragende Angebote unterstützen und voranbrachten.

Zu guter Letzt möchte ich mich herzlich bei Johannes Schwenck, meinen Eltern Toni und Marlene und bei meiner Familie und Freunden bedanken für die motivierenden Worte und dafür, dass ihr mir jederzeit zur Seite steht und mich unterstützt.