

Aus der
Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
(Schwerpunkt: Hämatologie, Onkologie, Gastroenterologie,
Nephrologie, Rheumatologie)

**Untersuchungen zur in vivo Modulation der frühen NK Zell
Entwicklung unter 5-AzaCytidin**

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

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

vorgelegt von

Brösamle, Ben Felix

2024

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. Dr. M. André

2. Berichterstatter: Professorin Dr. J. Feucht

Tag der Disputation: 23.09.2024

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Differenzierung und Funktionalitätserwerb humaner NK Zellen.....	1
1.2 Differenzierung und Funktionalitätserwerb muriner NK Zellen.....	4
1.3 NK Zellen in der Stammzelltherapie	6
1.4 5-Azacytidine	8
1.5 Vorarbeiten der AG André	10
1.6 S100A Proteine: Regulation von NK Zellen, Immunantworten und Tumorstadium	12
1.7 Ziel dieser Arbeit	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1 Material.....	16
2.1.1 Technische Geräte.....	16
2.1.2 Laborbedarf.....	17
2.1.3 Chemikalien & Reagenzien.....	18
2.1.4 Kulturmedien, Puffer & Stammlösungen	19
2.1.5 Antikörper	20
2.1.6 Zytokine	21
2.1.7 Zelllinien.....	21
2.1.8 Versuchstiere & Tierbedarf	22
2.1.9 Software.....	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellkultur: RMA-S.....	24

2.2.2	Versuchstiere	24
2.2.2.1	Haltung und Zucht	24
2.2.2.2	Übersicht Versuchsablauf K 06/20 G	25
2.2.2.3	Bestrahlung	26
2.2.2.4	Intraperitoneale Injektion	27
2.2.2.5	Probengewinnung	27
2.2.3	Analysen	27
2.2.3.1	Teilversuch 1: Einfluss von 5-AzaC auf die S100A8/A9 Konzentration im Serum	28
	Serumgewinnung für S100A8/A9 ELISA	28
	S100A8/A9 ELISA	28
2.2.3.2	Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen, Makrophagen und Progenitoren	28
	Herstellung <i>Single Cell Suspension</i>	29
	Erythrolyse	29
	Oberflächenfärbung	30
	Lebend/tot Differenzierung	30
	Durchflusszytometrie und Auswertung	31
	<i>Gating</i> -Strategie	31
	<i>Pregating</i>	31
	<i>Gating</i> hämatopoetische Vorläuferzellen	31
	NK Zell <i>Gating</i>	33
	Monozyten/Makrophagen und weiteres <i>Gating</i>	34
2.2.3.3	Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen	34
	Tag 1	35
	Herstellen einer <i>Single Cell Suspension</i>	35

Erythrolyse	35
Aktivierung der Effektoren	35
CFDA-SE Färbung RMA-S	35
Tag 2	36
Vorbereitung der <i>Targets</i> (RMA-S)	36
Vorbereitung der Effektoren	37
Anlegen des <i>in vitro kills</i>	37
Lebend/tot Differenzierung	38
Durchflusszytometrie und Auswertung	38
2.2.4 Auswertung und Statistik	39
3. Ergebnisse	41
3.1 Teilversuch 1: Einfluss von 5-AzaC auf die S100A8/A9	
Konzentration im Serum	41
3.1.1 Inflamationsreaktion an Tag 17, 21 und 28	41
3.1.2 Kinetik der S100A8/A9-vermittelten Inflamationsreaktion	42
3.2 Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen, Makrophagen und	
Progenitoren	43
3.2.1 NK Zell Regeneration während der frühen hämatopoetischen	
Rekonstitution: Knochenmark	43
3.2.2 NK Zell Regeneration während der frühen hämatopoetischen	
Rekonstitution: Milz	46
3.2.3 NK Zell Reifung während der frühen hämatopoetischen	
Rekonstitution: Knochenmark	48
3.2.4 NK Zell Reifung während der frühen hämatopoetischen	
Rekonstitution: Milz	49
3.2.5 Phänotypische Reifung von murinen NK Zellen während der	
frühen hämatopoetischen Rekonstitution	52

3.2.6	F4/80 ⁺ Monozyten/Makrophagen Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	54
3.2.7	Makrophagen Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Milz.....	57
3.2.8	Lineage ⁻ Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	59
3.2.9	Lineage ⁻ Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Milz.....	61
3.2.10	<i>Common Lymphoid Progenitors</i> (CLPs) Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution.....	63
3.2.11	<i>Common Myeloid Progenitors</i> (CMPs) Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution.....	66
3.2.12	Regeneration von <i>Megakaryocyte-erythroid Progenitors</i> (MEPs) und <i>Granulocyte-monocyte Progenitors</i> (GMPs) während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution.....	68
3.2.13	Regeneration hämatopoetischer Vorläuferzellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: CD34 und CD117 Expression im Knochenmark.....	70
3.3	Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung von NK Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution	75
3.3.1	Spezifischer <i>kill</i> Milz.....	75
3.3.2	Spezifischer <i>kill</i> Knochenmark	80
4.	Diskussion.....	85
5.	Zusammenfassung und Ausblick.....	95
6.	Literaturverzeichnis.....	97
7.	Erklärung zum Eigenanteil.....	111
	Danksagung.....	112

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Humane NK Zell Entwicklung	3
Abbildung 2: Murine NK Zell Entwicklung.....	5
Abbildung 3: Entwicklungsstadien muriner mNK	6
Abbildung 4: <i>Gene silencing</i> Mechanismus.....	9
Abbildung 5: Skizze zeitlicher Ablauf.....	25
Abbildung 6: <i>Pregating</i> Rohdaten.....	31
Abbildung 7: Gating hämatopoetischer Vorläuferzellen.....	32
Abbildung 8: NK Zellen <i>Gating</i>	33
Abbildung 9: Makrophagen und weiteres <i>Gating</i>	34
Abbildung 10: Vorgehen statistische Auswertung	40
Abbildung 11: Serumkonzentration von S100A8/A9 im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution	42
Abbildung 12: Kinetik der Inflammationsreaktion als Verlauf der S100A8/A9 Serumkonzentration	43
Abbildung 13: NK Zell Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	45
Abbildung 14: NK Zell Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz	47
Abbildung 15: NK Zell Reifung im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	49
Abbildung 16: NK Zell Reifung im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz	51
Abbildung 17: Subgruppen Entwicklung von mNK im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark	53
Abbildung 18: Subgruppen Entwicklung im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz	54
Abbildung 19: Monozyten/Makrophagen Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark	56
Abbildung 20: Monozyten/Makrophagen Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz	58

Abbildung 21: Lineage- Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	60
Abbildung 22: Lineage- Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz	62
Abbildung 23: Common Lymphoid Progenitors (CLPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark	64
Abbildung 24: Common Lymphoid Progenitors (CLPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz	65
Abbildung 25: Common Myeloid Progenitors (CMPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark	67
Abbildung 26: CD34 Expression im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	72
Abbildung 27: CD117 Expression im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark.....	74
Abbildung 28: Spezifischer kill Milz Tag 7	76
Abbildung 29: Spezifischer kill Milz Tag 17	77
Abbildung 30: spezifischer kill Milz Tag 21	78
Abbildung 31: Spezifischer kill Milz Tag 28	79
Abbildung 32: Spezifischer kill Knochenmark Tag 7.....	80
Abbildung 33: Spezifischer kill Knochenmark Tag 17.....	81
Abbildung 34: Spezifischer kill Knochenmark Tag 21.....	82
Abbildung 35: Spezifischer kill Knochenmark Tag 28.....	84

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technische Geräte.....	16
Tabelle 2: Laborbedarf	17
Tabelle 3: Chemikalien & Reagenzien.....	18
Tabelle 4: Stammlösungen	19
Tabelle 5: Zusammensetzung Puffer und Zellkulturmedium.....	19
Tabelle 6: Antikörper	20
Tabelle 7: Zytokine	21
Tabelle 8: Zelllinien.....	21
Tabelle 9: verwendete Versuchstiere	22
Tabelle 10: Tierbedarf	23
Tabelle 11: Software.....	23
Tabelle 12: Übersicht Versuchstiere	26
Tabelle 13: Titration FVS520	30
Tabelle 14: Pipettieren eines Zytotoxizitätstests mittels ivk	38
Tabelle 15: Lineage ⁻ Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz.....	61
Tabelle 16: <i>Common Lymphoid Progenitors</i> (CLPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution	63
Tabelle 17: <i>Common Myeloid Progenitors</i> (CMPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution	67
Tabelle 18: <i>Megakaryocyte-erythroid Progenitors</i> (MEPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution	69
Tabelle 19: <i>Granulocyte-monocyte Progenitors</i> (GMPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution	70
Tabelle 20: Spezifischer kill Knochenmark Tag 21	82
Tabelle 21: Spezifischer kill Knochenmark Tag 28	83

Abkürzungsverzeichnis

5-AzaC	5-Azacytidine (Handelsname: Vidaza)
Abb.	Abbildung
ADCC	<i>Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity</i> (Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität)
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
CA	<i>California</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (Unterscheidungsgruppen)
CFDA-SE	Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester
CILP	<i>Common Innate Lymphoid Progenitor</i> (gemeinsame angeborene lymphoide Vorläuferzellen)
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i> (gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle)
cMoP	<i>Common Monocyte Progenitor</i>
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i> (gemeinsame myeloische Vorläuferzelle)
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CXCR	<i>CXC Chemokine Receptor</i> (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor)
DAMP	<i>Damage Associated Molecular Pattern</i> (Schaden-assoziierte molekulare Muster)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EMMPRIN	<i>Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer</i> (Metalloproteinase-Induktor für die extrazelluläre Matrix)

FA	Formaldehyd
FAB	<i>French-American-British</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Scanning</i> (Fluoreszenz-aktiviertes Zell-Scannen)
FasL	<i>Fas Ligand</i> (Fas-Ligand, CD178)
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i> (Fetales Kälberserum)
FDR	<i>False Discovery Rate</i> (Falscherkennungsrate)
FLT3R	<i>FMS-like Tyrosine kinase 3 Receptor</i> (FMS-verwandter Tyrosinkinase-3-Ligand)
FLT3L	<i>FMS-like Tyrosine kinase 3 Ligand</i> (FMS-verwandter Tyrosinkinase-3-Ligand)
FSC-A	<i>Forward Scatter Area</i> (Vorwärtsstreubereich)
FVS-520	<i>Fixable Viability Stain 520</i> (fixierbarer lebend/tot Farbstoff)
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor</i> (Granulozyten-Monozyten-Kolonien-stimulierender Faktor)
GMP	<i>Granulocyte-Monocyte Progenitor</i>
GvHD	<i>Graft-versus-Host-Disease</i> (Graft-versus-host-Erkrankung)
GvL	<i>Graft-versus-Leukemia</i> (Graft-versus-Leukämie)
GZMB	Für Granzym B kodierendes Gen
HLA	Humane Leukozyten-Antigene
HSC	Hematopoietic Stem Cell (Hämatopoetische Stammzelle)
ID2	<i>Inhibitor of DNA Binding 2</i> (Inhibitor der DNA-Bindung 2)
IFN- γ	Interferon- γ
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ILC	<i>Innate Lymphoid Cell</i> (Lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems)
iNK	<i>immature NK cell</i> (unreife NK Zelle)
ivk	<i>in vitro kill</i>
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie

KIR	<i>Killer-cell Immunglobulin-like Receptors</i>
KLRG1	<i>Killer cell Lectin-like Receptor G1</i>
Lin ⁻	<i>Lineage negative cells (abstammungsnegative Zellen)</i>
LMPP	<i>Lympho-Myeloid Primed Progenitor cell</i>
Ly6G	<i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>
MA	Massachusetts
MAPK	Mitogen-Aktivierte Proteinkinasen
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEP	<i>Megakaryocyte-Erythroid Progenitor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIC	<i>MHC Class I Polypeptide-Related Sequence</i> (MHC Klasse I Polypeptid verwandte Sequenz)
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
mNK	<i>mature NK cell</i> (reife NK Zelle)
MO	<i>Missouri</i>
MRP	<i>Myeloid-Related Protein</i>
NCR	<i>Natural Cytotoxicity Receptors</i> (natürliche Zytotoxizitätsrezeptoren)
NF-κB	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B- cells</i>
NFIL3	<i>Nuclear Factor, Interleukin 3 Regulated</i>
NH	<i>New Hampshire</i>
NKp46	<i>Natural Killer cell protein 46 (CD335)</i>
NKP	<i>NK lineage-restricted Progenitor</i>
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
NSG	<i>NOD Scid Gamma mouse</i>
ON	<i>Ontario</i>
OR	<i>Oregon</i>

PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate-Buffered Saline (dt.: Phosphatgepufferte Salzlösung)
PBSE	<i>Pacific Blue Succinimidyl Ester</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
pre-NKP	<i>pre-NK cell Progenitor</i>
PRF1	Perforin 1
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RAGE	<i>Receptors for Advanced Glycation Endproducts</i>
rNKP	<i>refined NK cell Progenitor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Reaktive Sauerstoffspezies)
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i>
Sca-1	Stem cell antigen-1
SCF	<i>Stem Cell Factor</i> (Stammzellfaktor)
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SSC-A	<i>Side Scatter Area</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TAP	<i>Transporter associated with Antigen Processing 2</i> (Antigenpeptid-Transporter 2)
T-bet	T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21
TLR	<i>Toll-Like-Receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAIL	Tumor Necrosis Factor Related Apoptosis Inducing Ligand
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A)
WA	Washington
WI	Wisconsin

1. Einleitung

1.1 Differenzierung und Funktionalitätserwerb humaner NK Zellen

Anders als lange angenommen, haben NK Zellen ihren Ursprung nicht nur im Knochenmark. Auch in sekundären lymphatischen Organen und primär nicht der Immunabwehr zugehörigen Organen wie Leber und Uterus findet die Entwicklung und Reifung von NK Zellen statt. Organabhängig bestehen immunphänotypische Unterschiede (Freud et al., 2005, Vacca et al., 2011, Moroso et al., 2011). Beim gesunden Individuum sind 5-15% aller peripherer mononukleärer Zellen (PBMCs) NK Zellen (Claus et al., 2009).

Durch die Anwendung der Cluster of Differentiation (CD) Nomenklatur, die die Expression von Oberflächenmolekülen auf Zellen beschreibt und zur Klassifizierung sowie Identifizierung von unterschiedlichen Entwicklungsstufen und Zellpopulationen dient, lässt sich die Differenzierung der NK Zellen aus CD45⁺ hämatopoetischen Stammzellen (HSC) detailliert beschreiben. Wie alle Leukozyten gehen auch humane NK Zellen aus Lin⁻CD34⁺CD133⁺CD244⁺ HSCs hervor. In einem ersten Differenzierungsschritt geht das Megakaryozyten und Erythrozyten Potential verloren und es entstehen CD45RA⁺ *Lympho-Myeloid Primed Progenitor cells* (LMPP) (Luc et al., 2008, Akashi et al., 1999). Durch Zell-Zell-Interaktionen mit Stromazellen entstehen daraus lin⁻CD127⁺Sca-1⁺CD117⁺ *Common Lymphoid Progenitors* (CLPs) (Kondo et al., 1997a).

Aus CLPs können sich neben B- und T-Zellen auch innate lymphoide Zellen (ILCs) entwickeln (Kondo et al., 1997b, Vivier et al., 2018). NK Zellen bilden zusammen mit ILC1s die Gruppe 1 der ILCs (Spits et al., 2013). ILCs und NK Zellen besitzen beide die Fähigkeit zur IFN- γ -Sekretion. Sie können anhand ihrer unterschiedlichen Abhängigkeit von Transkriptionsfaktoren sowie ihrer unterschiedlichen Expression von Oberflächenmarkern unterschieden werden (Vivier et al., 2018). NK Zellen sind in ihrer Entwicklung obligatorisch auf den Transkriptionsfaktor EOMES, aber nicht auf den Transkriptionsfaktor T-Box-Transkriptionsfaktor TBX21 (T-bet), angewiesen (Simonetta et al., 2016, Daussy

et al., 2014). ILC1s benötigen hingegen zwingend den Transkriptionsfaktor T-bet, um sich zu entwickeln (Klose et al., 2014).

Der früheste definitive NK Zell Vorläufer kann über den Oberflächenphänotyp $\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD123}^- \text{CD45RA}^+ \text{CD7}^+ \text{CD10}^+ \text{CD127}^-$ charakterisiert werden. Diese *NK lineage-restricted Progenitors* (NKP) finden sich neben dem Knochenmark auch in fetalem Gewebe und Nabelschnurblut (Renoux et al., 2015).

Voraussetzung für die Differenzierung in Richtung NK Zelle ist das richtige Mikromilieu, das neben Stammzellfaktor (SCF) auch *FMS-like Tyrosine kinase 3 Ligand* (FLT3L) und Interleukin-7 (IL-7) beinhaltet (Di Santo, 2006).

Für die funktionelle Reifung und das Überleben der NK Zell-Vorläufer ist IL-15 obligatorisch, weshalb der Erwerb der Beta-Kette des Interleukin-15-Rezeptors (IL-15R = CD122) Voraussetzung für die weitere Differenzierung ist (Becknell and Caligiuri, 2005). Im Stadium der *immature NK cell* (iNK) geht die Oberflächenexpression von CD34 verloren und sequenziell werden aktivierende Rezeptoren wie NKG2D, CD335 (NKp46), CD337 (NKp30) und CD161 exprimiert (Freud et al., 2006, Grzywacz et al., 2006, Perussia et al., 2005). CD161 wird neben iNK- und mNK-Zellen auch von natürlichen Killer-T-Zellen und $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert und ist daher kein spezifischer Oberflächenmarker für NK Zellen.

Zu diesem Zeitpunkt zeigen die nun als reif bezeichneten NK Zellen (mNK) die stärkste CD56-Expression ($\text{CD56}^{\text{bright}}$). Charakteristisch in diesem Stadium ist eine bedeutende Produktion inflammatorischer Zytokine bei niedriger Zytotoxizität (Cooper et al., 2001). Obwohl $\text{CD56}^{\text{bright}}$ NK Zellen nur ca. 10% aller NK Zellen im peripheren Blut ausmachen, sind sie die Hauptquelle von NK Zell abgeleiteten immunregulatorischen Zytokinen (Cooper et al., 2001, Jacobs et al., 2001).

Im weiteren Verlauf kommt NKG2A als inhibierender und NKp80 als aktivierender Rezeptor hinzu (Vitale et al., 2001, Welte et al., 2006). Die Herabregulierung von CD56 (CD56^{dim}) und die Expression von CD16 folgen und gehen mit einer Zunahme der Anti-Tumor-Zytotoxizität einher (Jacobs et al., 2001). Es gibt zudem

Hinweise dafür, dass $CD56^{dim}$ NK Zellen auch direkt aus iNKs hervorgehen können (Mace et al., 2013). Der finale Reifungsschritt wird über die Expression von CD57 definiert. Diese NK Zellen zeigen kaum Proliferation und haben gedächtnisähnliche Funktionen (Kared et al., 2016).

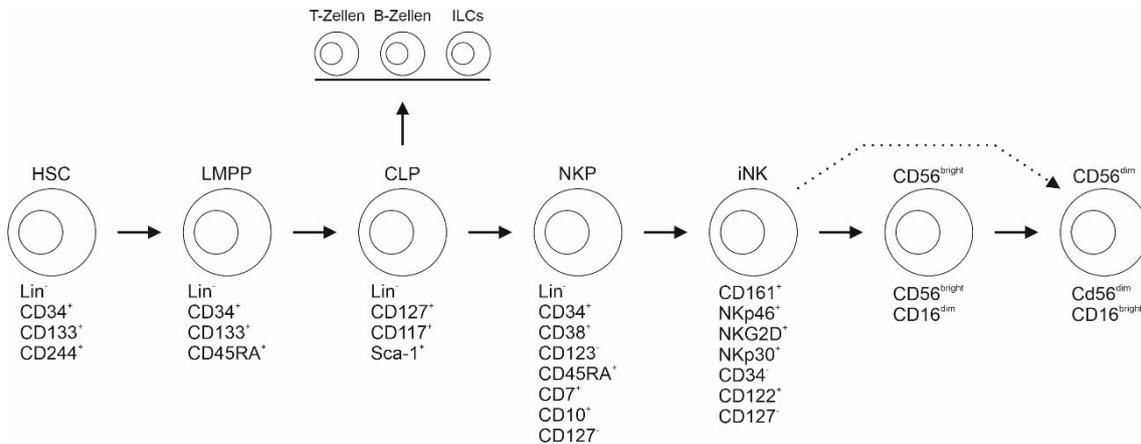


Abbildung 1: Humane NK Zell Entwicklung
Idee übernommen von (Abel et al., 2018)

Anders als B- und T-Zellen sind NK Zellen in der Lage, auch ohne vorangegangene Sensibilisierung direkt gegen Zielzellen, wie etwa virusinfizierte Zellen, Krebszellen oder seneszente Zellen, zu agieren (Kieśliling et al., 1975, Vivier et al., 2008, Wu and Lanier, 2003, Antonangeli et al., 2019, Biron, 1997). Der *Missing-self-Hypothese* folgend, führt das Aufeinandertreffen von NK Zellen und MHC-Klasse-I defizienten hämatopoetischen Zellen, die auf diesem Weg versuchen sich der Immunantwort zu entziehen, zur Aktivierung der NK Zellen mit anschließender Lyse der Zielzellen (Trinchieri, 1989).

Insbesondere $CD56^{dim}CD16^{bright}$ NK Zellen setzen nach erfolgter Aktivierung zytolytische Granula frei. Das darin unter anderem enthaltene Perforin bildet Poren in der Zielzellmembran und ermöglicht das Eindringen pro-apoptotischer Serinproteasen (Granzyme) (Smyth et al., 2005, Lieberman, 2003).

Neben ihrer direkten Anti-Tumor-Zytotoxizität können NK Zellen, allen voran $CD56^{bright}CD16^{dim}$ NK Zellen, über die Freisetzung von IFN- γ weitere der antiviralen und antitumoralen Immunität dienende Effekte vermitteln. Hierzu zählt neben einer vermehrten Makrophagen Aktivierung (Nathan et al., 1983) auch die Verbesserung der Virus/Tumorerkennung. Ursächlich hierfür ist die gesteigerte

Produktion und Präsentation von Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse-I (MHC-Klasse-I) und MHC-Klasse-II Molekülen (Rosa and Fellous, 1988). Darüber hinaus ist IFN- γ entscheidend an der Differenzierung und Aktivierung zytotoxischer CD8-Zellen beteiligt (Maraskovsky et al., 1989). Hierdurch üben NK Zellen als Zellen der angeborenen Immunität eine Brückenfunktion zur Einleitung der erworbenen Immunität aus.

1.2 Differenzierung und Funktionalitätserwerb muriner NK Zellen

CD56 oder ein eindeutiges Korrelat fehlt in der Maus. Im Moment gilt hier das *Natural Killer cell protein 46* (NKp46, entspricht CD335) als spezifischer NK Zell Marker (Walzer et al., 2007, Barrow et al., 2019). Der NK Zell Anteil an den Leukozyten beträgt im Knochenmark von C57BL/6J Inzuchtstämmen 1-2% und in der Milz 2-3% (Grégoire et al., 2007).

Der Hauptteil muriner NK Zellen entsteht in perivaskulären KM-Nischen aus Lin⁻Sca-1⁺CD117⁺CD48⁻CD150⁺ HSC (Boulais and Frenette, 2015, Challen et al., 2009). Wie im humanen Organismus entstehen daraus zunächst LMPPs die den *FMS-like Tyrosine kinase 3 Receptor* (FLT3R = CD135) exprimieren (Adolfsson et al., 2005b). Im nächsten Schritt geht das myeloische Potential verloren und es entstehen CLPs (Adolfsson et al., 2005a, Arinobu et al., 2007, Kondo et al., 1997b). Der Transkriptionsfaktor ETS-Proto-Onkogen 1 (ETS1) ist dabei an der Zelllinienspezifikation in Richtung NK Zelle entscheidend beteiligt (Ramirez et al., 2012). Murine CLPs werden über den Zelloberflächenphänotyp Lin⁻CD127⁺Thy-1⁻Sca^{low}CD117^{low}CD135⁺ definiert (Kondo et al., 1997a). Unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors NFIL3 geht das B- u. T-Zell-Potential verloren und Lin⁻CD117⁻CD27⁺CD244⁺CD122⁻CD127⁺CD135⁻ *pre-NK cell Progenitors* (pre-NKP) entwickeln sich (Fathman et al., 2011).

Mit der Expression der β -Kette des IL-2-Rezeptors (CD122) entstehen Lin⁻CD27⁺CD244⁺CD122⁺CD135⁻ *refined NK cell Progenitors* (rNKP) (Rosmaraki et al., 2001, Male et al., 2014).

Aus *rNKPs* werden bei supprimierter Protein-E-Aktivität *iNKs*. Verantwortlich für die Suppression der Protein-E-Aktivität ist der Transkriptionsfaktor *Inhibitor of DNA Binding 2* (ID2) (Yokota et al., 1999, Boos et al., 2007). Murine *iNKs* besitzen geringe bis keine Zytotoxizität und sind unfähig, IFN- γ freizusetzen (Rosmaraki et al., 2001). Neben den grundlegenden NK Zell Markern NK1.1 (entspricht humanem CD161), NKp46 (CD335) und DNAM-1 (CD226) exprimieren *iNKs* auch inhibitorische Rezeptoren (Kim et al., 2002, Goh and Huntington, 2017). Dazu gehören neben CD94-NKG2 auch membranständige C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptoren aus der Ly49-Familie. Diese verhindern eine vorzeitige Aktivierung der NK Zellen im KM (Raulet et al., 1997).

Der Erwerb der Oberflächenproteine CD51 (Integrin α -V) und nachfolgend CD49b (Integrin α -2, DX5) aus der Gruppe der Integrine markiert das Erreichen des Stadiums der *mature NK cell* (mNKs) (Kim et al., 2002, Arase et al., 2001). CD43 (Leukosialin), CD62L (L-Selektin), CD146 (MCAM), CD160 und CD11b (Mac-1) sowie verschiedene inhibierende und aktivierende Ly49-Rezeptoren wie Ly49A, Ly49C/I, Ly49G oder Ly49D kommen im weiteren Verlauf dazu (Chiossone et al., 2009, Kim et al., 2002, Zafirova et al., 2009, Peng et al., 2013, Despoix et al., 2008, Tu et al., 2015). Der *Killer cell Lectin-like Receptor G1* (KLRG1) Rezeptor wird von mNKs nach Migration in sekundäre lymphatische Organe exprimiert und dient als Seneszenz Marker (Huntington et al., 2007, Robbins et al., 2004).

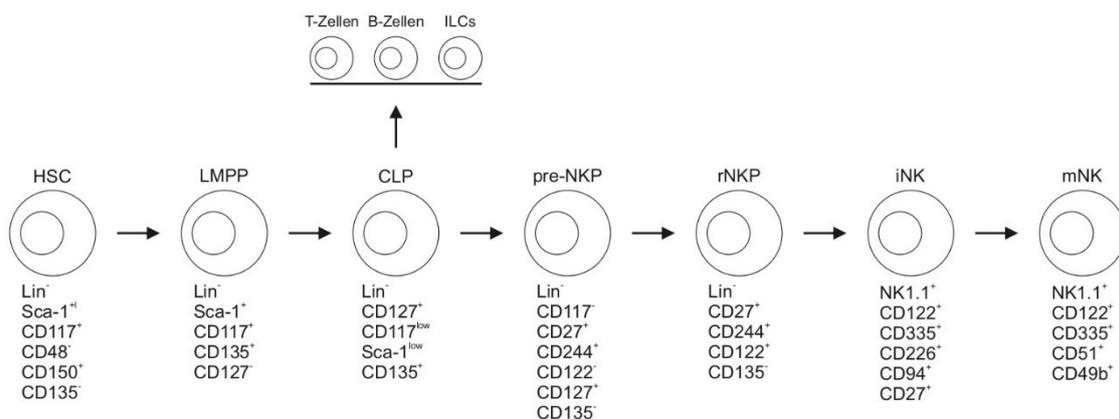


Abbildung 2: Murine NK Zell Entwicklung
Idee übernommen von (Abel et al., 2018)

Es konnte gezeigt werden, dass anhand der Expression von CD11b u. CD27 eine Einteilung von mNK's in vier konsequente, funktionelle Stadien möglich ist: Sogenannte doppeltnegative $CD11b^{low}CD27^{low}$ NK Zellen entwickeln sich konsekutiv über $CD11b^{low}CD27^{high}$ und anschließend $CD11b^{high}CD27^{high}$ zu $CD11b^{high}CD27^{low}$ NK Zellen. Wichtige Gene, die für die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität verantwortlich sind, wie zum Beispiel Granzym B und Perforin, werden im Verlauf dieses Reifungsprozesses hochreguliert und führen zu einer Zunahme der Zytotoxizität bei gleichzeitiger Abnahme der Proliferationskapazität entlang der vier gezeigten Entwicklungsstufen (Chiossone et al., 2009).

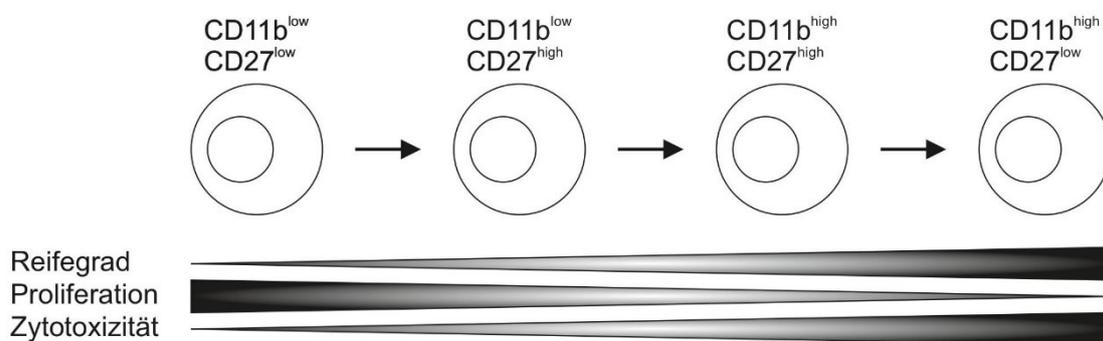


Abbildung 3: Entwicklungsstadien muriner mNK
Nach (Chiossone et al., 2009)

1.3 NK Zellen in der Stammzelltherapie

Die Entdeckung und Typisierung humaner Leukozytenantigene (HLA) ermöglichte die Etablierung eines neuen, kurativen Ansatzes zur Leukämiebehandlung: Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (allo-SZT). Hierbei werden nach Konditionierung des Empfängers hämatopoetische Stammzellen eines Spenders infundiert, der eine sehr hohe HLA-Kompatibilität zeigt.

Das Rezidivrisiko nach einer SZT variiert je nach Patientenrisikoprofil und HLA-Kompatibilität. Kommt es zu einem Rezidiv, kann nur noch selten eine langfristige Remission erreicht werden (Bejanyan et al., 2015). Rezidive sind daher für die meisten posttransplantären Todesfälle ursächlich (Styczyński et al., 2020, Horowitz et al., 2018). Die effektive Beseitigung der nach Konditionierung noch

im Empfänger verbliebenen Leukämiezellen (minimale Resterkrankung) ist für den langfristigen Therapieerfolg entsprechend obligat.

Hierfür entscheidend ist der sogenannte *Graft-versus-Leukemia* (GvL) Effekt. Dieser antileukämische Effekt wird durch Immunzellen des Spenders vermittelt und wird in erster Linie durch T-Zellen und NK Zellen getragen (Jiang et al., 1997, Truitt and Atasoylu, 1991). T-Zellen sind gleichzeitig jedoch für die Entstehung der *Graft-versus-Host-Disease* (GvHD) verantwortlich und machen den Einsatz prophylaktischer Immunsuppression nach SZT erforderlich (Zeiser and Blazar, 2017, Yu et al., 2019). Anders als früher angenommen, zeigen neuere Studien an Mäusen und Menschen, dass NK Zellen nicht nur nicht an der Entstehung einer GvHD beteiligt sind, sondern dieser sogar aktiv entgegenwirken (Murphy et al., 1992, Ruggeri et al., 2002).

Verantwortlich hierfür ist die Alloreaktivität von NK Zellen zwischen Spender und Empfänger (Ruggeri et al., 2002). Alloreaktive NK Zellen besitzen die Fähigkeit antigenpräsentierende dendritische Zellen des Empfängers abzutöten (Meinhardt et al., 2015, Ruggeri et al., 2002). Diese präsentieren Alloantigene des Wirts und können dadurch eine T-Zell-vermittelte GvHD auslösen (Shlomchik et al., 1999). Alloreaktive NK Zellen sind zudem in der Lage, alloreaktive T-Zellen direkt zu lysieren (Olson et al., 2010, Ruggeri et al., 2002).

Die GvL-Effekte von NK Zellen sind vor allem in der frühen posttransplantären Phase entscheidend, da NK Zellen von allen Lymphozyten nach Transplantation am schnellsten rekonstituieren (Niederwieser et al., 1987). Obwohl normale NK Zellzahlen bereits einen Monat nach Transplantation beobachtet werden können, ist ihre Fähigkeit zur Lyse und Zytokinsekretion in dieser frühen Phase noch beeinträchtigt (Foley et al., 2011, Pittari et al., 2010). Auch ist das Wissen darüber, wie unreife NK Zellen Leukämien erkennen und eliminieren, bestenfalls gering. Das Verstehen der Funktionalität unreifer NK Zellen ist daher für die Optimierung des NK-Zell-vermittelten GvL-Effekts unabdingbar und begründet die aktuellen Forschungsbemühungen der AG André.

1.4 5-Azacytidine

5-Azacytidine (Azacytidine, 5-AzaC) und 2'-Deoxy-5-Azacytidine (Decitabine) wurden ursprünglich als Nukleosid-Antimetabolite zur Behandlung der akuten myeloischen Leukämie (AML) synthetisiert (Sorm et al., 1964, Cihák, 1974). Azanukleoside sind bei Raumtemperatur (20°C) instabile Substanzen mit einer Halbwertszeit von 37h (Azacytidine) bzw. 96h (Decitabine) (Stresemann and Lyko, 2008). Beim Umgang mit ihnen ist entsprechende Vorsicht geboten.

Bei 5-AzaC handelt es sich um ein aus *Streptoverticillium ladakanus* isolierbares Cytidinanalagon (Bergy and Herr, 1966). Nach intrazellulärer Aktivierung zu 5-AzaC-Triphosphat erfolgt der Einbau an Stelle von Cytosin in die RNA. Es entsteht außerdem 5-Aza-2'-deoxycytidin-Triphosphat, das für die DNA-Synthese verwendet wird (Li et al., 1970). Daraus resultiert eine Hemmung der DNA-, RNA- und Proteinsynthese. DNA-Schäden, Zellzyklusarrest und Apoptose sind die Folgen (Li et al., 1970, Veselý and Čihák, 1978). Neben seiner direkten zytotoxischen Wirkung vermittelt 5-AzaC seine antineoplastische Wirkung auch über die irreversible Hemmung von DNA-Methyltransferasen (DNMT) (Friedman, 1981, Jones et al., 1983). DNMTs erkennen Azacytosin-Guanin-Dinukleotide als Substrat. Die bei der Methylierung entstehende Bindung ist kovalent und wird normalerweise über β -Eliminierung gelöst. Mit Azacytosin ist diese Reaktion jedoch blockiert (Santi et al., 1984). Die Irreversibilität der Bindung führt zum Funktionsverlust und anschließendem Abbau der DNMT (Stresemann and Lyko, 2008, Christman et al., 1983, Creusot et al., 1982). Die Folge ist eine globale Hypomethylierung der DNA. Hierfür sind bereits geringe Mengen an 5-AzaC ausreichend, die die DNA-Synthese nicht supprimieren (Issa, 2005).

Durch Hypermethylierung bedingtes *Gene-Silencing* kann so rückgängig gemacht werden und epigenetisch stillgelegte Tumorsuppressorgene wieder aktiv werden. Dadurch kann die Zellzykluskontrolle, die Apoptosesensitivität und die Ausdifferenzierung abnormal wachsender Zellen rekonstituiert werden (Newell-Price et al., 2000, Esteller, 2007). Die genaue Bedeutung von 5-AzaC für die Differenzierung gesunder hämatopoetischer Vorläufer ist derzeit noch unklar.

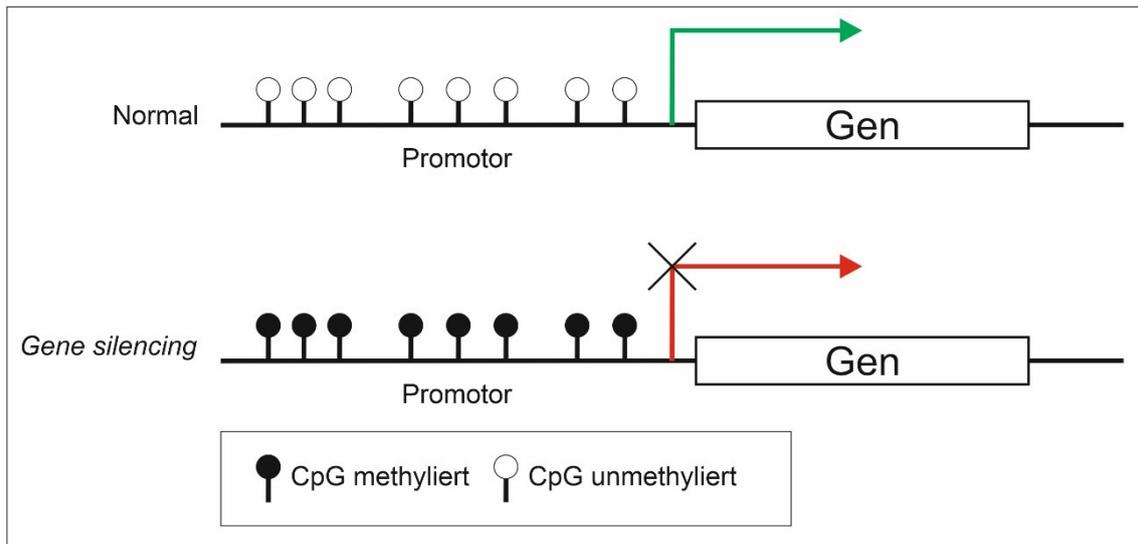


Abbildung 4: *Gene silencing* Mechanismus
Idee übernommen von (Herman and Baylin, 2003)

Praktische Anwendung findet 5-AzaC seit vielen Jahren in der Behandlung des MDS und der AML. Seit 2004 besteht eine Zulassung für 5-AzaC durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) für die Behandlung von myelodysplastischen Neoplasien (MDS) sowie der AML (Kaminskas et al., 2005). Im Mai 2022 erhielt es die Zulassung zur Behandlung von pädiatrischen Patienten mit neu diagnostizierter juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML) (Niemeyer et al., 2021).

Für die myelodysplastischen Neoplasien (MDS), bei denen es sich um klonale Erkrankungen der hämatopoetischen Stammzelle mit gestörter Differenzierung handelt, wurde nachgewiesen, dass die aberrante Methylierung von Promotor-assoziierten Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln (CpG-Inseln) dazu führt, dass Tumorsuppressorgene wie *CDKN2B* nicht mehr transkribiert werden und somit eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese spielen (Uchida et al., 1997). Eine Therapie mit 5-AzaC kann folglich nicht nur direkt durch die zytotoxische Wirkung des Medikaments wirken, sondern auch durch die Differenzierung prä-maligner Klone, was zu einer signifikanten Verlängerung der durchschnittlichen Überlebenszeit bestimmter Patientengruppen führt (Fenaux et al., 2009, Silverman et al., 2002).

1.5 Vorarbeiten der AG André

Ein von der Arbeitsgruppe André angedachter Ansatz zur Verbesserung des NK Zell-vermittelten GvL-Effekts besteht darin, 5-AzaC frühzeitig nach SZT in subtherapeutischen Dosierungen einzusetzen, um die Beseitigung der minimalen leukämischen Resterkrankung zu fördern.

In einem Spender-Patient spezifischen Xenotransplantationsmodell in humanisierten NOD SCID IL2R γ ^{-/-} NSG-Mäusen wurden hierfür Stammzellen des spendenden Elternteils und Zellen einer akuten lymphatischen Leukämie (ALL) des betroffenen Kindes injiziert (Kübler et al., 2014, Woiterski et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von 5-AzaC in niedriger Dosierung zu einer signifikanten Verringerung der leukämischen Belastung führte (Kübler et al., 2014). Ursächlich hierfür war ein vermehrtes Vorkommen unreifer NK Zellvorläufer bei unveränderter Anzahl reifer NK Zellen (Kübler et al., 2014).

In nachfolgenden Tierversuchen konnte die AG André zeigen, dass subletal bestrahlte Mäuse, die mit 5-AzaC behandelt wurden, am 7. Tag nach der Bestrahlung höhere Frequenzen unreifer und reifer NK Zellen aufwiesen (Kübler et al., Manuskript in Vorbereitung).

Um den zugrunde liegenden Mechanismus zu verstehen, wurde im Anschluss der Einfluss von 5-AzaC auf die Differenzierung humaner HSC zu NK Zellen *in vitro* untersucht. Hierfür wurde ein etabliertes Protokoll zur Expansion humaner NK Zellen aus CD34-positiven Nabelschnurblutzellen verwendet (Spanholtz et al., 2010). Tatsächlich zeigte der mit 5-AzaC behandelte Ansatz an Tag 31 eine höhere zytotoxische Funktionalität im Vergleich zum Kontrollansatz (Ginsberg und André, Manuskript in Vorbereitung).

Auffällig war zudem ein erhöhter Anteil an Monozyten im mit 5-AzaC behandelten Kultursystem als Hinweis auf eine Verschiebung der Hämatopoese in Richtung der myeloischen Reihe. In der Vergangenheit konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass eine DNMT1 Hemmung eine solche Verschiebung der Differenzierung von HSC zur Folge haben kann (Hodges et al., 2011, Bröske et al., 2009). Die beobachtete Verschiebung der Hämatopoese könnte folglich

durch die irreversible Hemmung von DNMT1 durch die niedrigdosierte Zugabe von 5-AzaC Gabe erklärt werden (Friedman, 1981, Jones et al., 1983).

Durchflusszytometrische Analysen der AG André konnten zeigen, dass die Zugabe von 5-AzaC über eine irreversible Hemmung von DNMT zu einer deutlichen Reduktion der Cytosin-Methylierung und folglich zu einer anhaltenden globalen Gendemethylierung geführt hat. Bei der Quantifizierung von Transkriptionsfaktoren, die für die Entwicklung von NK Zellen wichtig sind, wie NFIL3, T-bet, TOX, EOMES, PU.1 u. ID2, mittels *Real-time* PCR wurde hingegen kein Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt (Ginsberg und André, Manuskript in Vorbereitung). Die AG schloss daraus, dass 5-AzaC nicht direkt in die Regulation der NK Zell Differenzierung eingreift.

Eine Transkriptomanalyse des Kultursystems am 17. Tag zeigte, dass alle in der 5-AzaC Gruppe überrepräsentierten Genklassen den Bereichen „Entzündung“ und „angeborene Immunantwort“ zuzuordnen waren. Interessanterweise gehörten die hochregulierten Gene mit der höchsten Signifikanz, d.h. der niedrigsten Falscherkennungsrate (FDR), alle zur S100A Proteinfamilie (S100A8, S100A9, S100A12). Mittels methylierungsspezifischer PCR konnte gezeigt werden, dass die Methylierung der Promotorregion dieser Gene in den mit 5-AzaC behandelten Proben reduziert war (Ku et al., 2011). Dieser Befund war zunächst überraschend, weil wenig über die Expression von S100A8/A9 bekannt ist. Wir wissen, dass die Synthese eines bestimmten S100-Proteins in nicht exprimierenden Zellen durch eine Behandlung mit 5-AzaC reaktiviert werden kann. Dies legt nahe, dass die S100A-Proteine tatsächlich einer epigenetischen Regulation unterliegen könnten (Leśniak et al., 2007). Ob dies neuartig in NK Zellen oder in anderen Zellen geschieht - denkbar wären hier Granulozyten oder Monozyten - war uns zum damaligen Zeitpunkt der Forschung unklar.

1.6 S100A Proteine: Regulation von NK Zellen, Immunantworten und Tumorwachstum

Die 1965 erstmalig beschriebene S100A Proteinklasse umfasst saure Proteine, die Kalzium binden (Moore and McGregor, 1965, Niki et al., 1996).

Die Calgranulin-Untergruppe besteht aus S100A8 (Calgranulin A, *Myeloid-Related Protein 8*, MRP8), S100A9 (Calgranulin B, *Myeloid-Related Protein 9*, MRP9) und S100A12 (Calgranulin C, *Myeloid-Related Protein 6*, MRP6). S100A8 und S100A9 gehen eine nicht kovalente Bindung ein und liegen kalziumunabhängig meist als heterodimerer Komplex namens Calprotectin vor (Leukert et al., 2005, Steinbakk et al., 1990). Nach der Bindung von Kalzium bilden sich (S100A8/A9)₂-Tetramere (Korndörfer et al., 2007). Die kalziumabhängige Oligomerisierung ist vermutlich für die Ausübung der biologischen Funktionen obligat (Leukert et al., 2006).

In Studien mit S100A9-defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass der *Knockout* des S100A9-Gens zu einem Fehlen von S100A8 auf Proteinebene führt (Manitz et al., 2003a, Hobbs et al., 2003).

Calprotectin wird in phagozytären myeloischen Zellen, wie Neutrophilen und Monozyten exprimiert (Dale et al., 1985, Odink et al., 1987). Daten aus der Methylierungsdatenbank *iMETHYL* belegen, dass S100A8, S100A9 und S100A12 in myeloischen Zellen im Vergleich zu lymphoiden Zellen, wie etwa NK Zellen, konstitutiv überexprimiert werden. Dies ist auf eine weitgehende Hypomethylierung der jeweiligen Promotorregion zurückzuführen (Leśniak, 2011).

In Bezug auf die AML konnte nachgewiesen werden, dass S100A9 die Differenzierung von entarteten myeloischen Vorläuferzellen induzieren kann, während S100A8 die Zelldifferenzierung hemmt und zur Aufrechterhaltung unreifer Zellvorläufer beiträgt (Laouedj et al., 2017).

Calprotectin zeigt *in vitro* antimikrobielle Effekte und spielt eine Rolle in der angeborenen Immunabwehr von Epithelzellen, in denen es unter

inflammatorischen Bedingungen exprimiert wird (Steinbakk et al., 1990, Sohnle et al., 1991, Kelly et al., 1989).

Während eines Inflammationsprozesses wird Calprotectin von aktivierten Neutrophilen und Monozyten nach extrazellulär sezerniert (Rammes et al., 1997). Als *Damage Associated Molecular Pattern (DAMP)* aktiviert S100A8/A9 dann das angeborene Immunsystem im Rahmen einer sterilen Entzündungsreaktion (Foell et al., 2007).

Calprotectin fungiert als Ligand für mehrere Rezeptoren, darunter den *Receptor for Advanced Glycation Endproducts (RAGE)*, den *Toll-Like-Receptor 4 (TLR4)* und das Glykoprotein *Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer (EMMPRIN oder Basigin)*.

Die Interaktion von Calprotectin mit dem RAGE-Transmembranrezeptor, der unter anderem auf Monozyten und Lymphozyten exprimiert wird, führt zur Aktivierung des *Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NF-κB)* (Ghavami et al., 2008, Boyd et al., 2008). Die Bindung von S100A8/A9 an TLR4 als DAMP führt über MAPK (Mitogen-Aktivierte Proteinkinasen) ebenfalls zur NF-κB Aktivierung (et al., 2007, Kawai and Akira, 2007).

NF-κB reguliert mehrere inflammations-assoziierte Gene (Liu et al., 2017). Die Aktivierung von NF-κB führt zur Freisetzung proinflammatorischer Faktoren wie TNF-α, IL-1, IL-6 sowie angiogenen und anti-apoptischen Proteinen, was über die Migration von Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen zu einem entzündlichen Mikromilieu führt (Ma et al., 2017, Nukui et al., 2008). Calprotectin ist zudem entscheidend an der Transmigration von Monozyten beteiligt (Chen et al., 2015). S100A9 defiziente Monozyten zeigten *in vitro* eine reduzierte Reaktion auf Chemotaxis im Vergleich zu Wildtypzellen (Manitz et al., 2003b).

Im Kontext der Hämatopoese stimuliert S100A8/A9 außerdem die Myelopoese RAGE-abhängig. Durch die Interaktion von S100A8/A9 mit RAGE auf CMPs und Makrophagen und der anschließenden Aktivierung des NF-κB Signalwegs kommt es zu einer verstärkten Sekretion von M-CSF bzw. GM-CSF. Als Folge

hiervon erfolgten eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung von Monozyten und Neutrophilen (Nagareddy et al., 2013).

In vivo wurde gezeigt, dass S100A8/A9 über den RAGE-Signalweg die Aktivierung und Proliferation von NK Zellen fördern kann, was zu einer erheblichen Verringerung des Tumorwachstums führt. Zudem kommt es nach der Aktivierung über den RAGE-Signalweg zu einer vermehrten IFN- γ Produktion durch die NK Zellen, was im Sinne einer positiven Rückkopplung zu einer Zytokinfreisetzung durch Makrophagen führt und ein inflammatorisches Milieu schafft (Narumi et al., 2015, Mosser and Edwards, 2008).

Der Bezug von S100A Proteinen zur NK Zell Bildung im Rahmen der Rekonstitution der Hämatopoese nach SZT ist bislang nicht beschrieben, es wird aber schon lange vermutet, dass Inflammationsreaktionen nach einer SZT mit einer Reifung des Transplantats (und hierdurch auch der NK Zellen) zusammenhängen (Elmaagacli et al., 2011, Green et al., 2013).

1.7 Ziel dieser Arbeit

Im Xenotransplantationsmodell mit humanisierten NOD SCID IL2R γ ^{-/-} NSG-Mäusen wurde gezeigt, dass 5-AzaC die frühe NK Zell-Bildung fördert und bereits unreife NK Zellen erstaunliche GvL Effekte zeigen können (Kübler et al., 2014). In Vorarbeiten der AG André wurde zudem gezeigt, dass 5-AzaC in Monozyten und dendritischen Zellen die Bildung von S100A-Proteinen initiiert. Ursächlich hierfür ist die irreversible Hemmung von DNMTs durch 5-AzaC, gefolgt von einer Demethylierung der Promotorregionen von S100A Proteinen, was zu einer verstärkten Expression führt. Dies führt zu einem lokalen proinflammatorischen Mikromilieu.

Die aufgestellte Hypothese besagt, dass eine niedrigdosierte 5-AzaC Therapie die Reifung und den Funktionalitätserwerb von NK Zellen anregt. Wir vermuten, dass die Entstehung eines lokalen Inflammationsmilieus, vermittelt durch S100A8/A9 Proteine, hierfür ursächlich verantwortlich ist. S100A-Proteine

könnten über definierte Rezeptoren an unreife NK Zellen binden und daraufhin deren Reifung und frühe Funktionalität stimulieren. Da NK Zellen entscheidend an GvL Effekten beteiligt sind, wäre eine niedrig dosierte 5-AzaC Therapie nach einer Stammzelltransplantation folglich eine nebenwirkungsarme Therapie, um posttransplantationäre GvL-Reaktionen zu intensivieren und das Rezidivrisiko zu verringern. Im Zusammenhang mit dem Cytomegalievirus (CMV) wurde bereits gezeigt werden, dass ein lokales Inflammationsgeschehen GvL-Effekte fördern kann (Elmaagacli et al., 2011, Green et al., 2013).

Das Ziel dieser Arbeit ist der Kausalitätsnachweis im Tiermodell. In C57BL/6J Mäusen soll verifiziert werden, dass eine niedrig dosierte 5-AzaC-Behandlung positive Auswirkungen auf die frühe NK Zellentwicklung und den Erwerb von Anti-Tumor Funktionalität im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution hat. Des Weiteren soll in S100A9-defizienten Mäuse gezeigt werden, dass die Funktionalität unreifer NK Zellen kausal mit der Expression von S100A8/A9 zusammenhängt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Tabelle 1: Technische Geräte

Produkt	Hersteller
Durchflusszytometer FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Durchflusszytometer LSR II	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Gammacell® 1000 Elite	Nordion, Ottawa, ON, Kanada
GFL 1002 Wasserbad	Lauda Dr. R. Wobser Lauda-Königshofen, DE
Heraeus HS-18 Sicherheitswerkbank	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Inkubator Hera Cell	Heraeus, Hanau, DE
Integra Pipetboy 2	Integra Biosciences AG Hudson, NH, USA
Mikro 22R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DE
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Neubauer Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH Co. KG, Sondheim v.d. Röhn, DE
IX 50 invers Mikroskop	Olympus Europa, Hamburg, DE
Pipetten Gilson P2, P10, P20, P100, P200, P1000	Gilson Incorporated Middleton, WI, USA
Rotina 420R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DE
Rotixa 50RS Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen, DE
Sterilbank Hera safe	Heraeus, Hanau, DE
Vortex-Schüttler Top-Mix 11118	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

2.1.2 Laborbedarf

Tabelle 2: Laborbedarf

Produkt	Hersteller
Cellstar® Kulturflasche 75cm ²	Greiner Bio-one International GmbH, Bad Hall, AT
Cellstar® 96-Well Zellkulturplatte round bottom	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Cellstar® 6-Well Zellkulturplatte flat bottom	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Cellstar® 12-Well Zellkulturplatte flat bottom	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Cyro.S™ Kyrotubes	Greiner Bio-one International GmbH, Bad Hall, AT
Einmal Nitrilhandschuhe, puderfrei	FCMU GmbH, München, DE
Falcon® 15ml	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Falcon® 50ml	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Parafilm M	Bemis Manufacturing Company, Sheboygan Falls, WI, USA
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Starlab GmbH, Hamburg, DE
Serological Pipette 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Zellschaber	Corning Incorporated Corning, NY, USA
Zellsieb 70µm "EASYstrainer"	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE

2.1.3 Chemikalien & Reagenzien

Tabelle 3: Chemikalien & Reagenzien

Produkt	Hersteller
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
5-Azacytidin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
ACK-Lysing Buffer	Lonza Group Ltd, Basel, CH
Biocoll® Trennlösung (1,077g/ml)	Bio&Sell, Feucht, DE
Cotrim-Ratiopharm Ampullen SF 480mg/5ml	Ratiopharm, GmbH, Ulm, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ethanol, absolute >99,8%	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Fixable Viability Stain 520	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Formaldehydlösung (FA) 30%	Carl-Roth, Karlsruhe, DE
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Gentamicin, 80mg/2ml SF	Ratiopharm GmbH, Ulm, DE
L-Glutamine (L-Glu)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Na-EDTA (0,25M)	Universitätsapotheke, Tübingen, DE
Nicht-Essentielle Aminosäuren (NEA)	Bioswisstec AG, Schaffhausen, CH
<i>Pacific Blue Succinimidyl Ester</i> (PBSE)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA
Penicillin-Streptomycin (P/S, 10.000 U/ml, 10mg/ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Sodium Pyruvate</i>	Bioswisstec AG, Schaffhausen, CH
Trypanblau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
UltraComp eBeads Compensation Beads	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
Vybrant Carboxyfluoreszein-Diacetat-Succinimidylester (CFDA SE) Cell Tracer	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA

2.1.4 Kulturmedien, Puffer & Stammlösungen

Tabelle 4: Stammlösungen

Produkt	Hersteller
<i>Phosphate Buffered Saline</i> (PBS)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
RPMI 1640	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tabelle 5: Zusammensetzung Puffer und Zellkulturmedium

Stammlösung	Herstellung
CFDA-SE (10mM)	500µg CFDA gelöst in 90µl DMSO
Einfriermedium	50% RPMI 1640 40% FCS 10% DMSO
FACS-Fix	FACS Puffer 1% FA
FACS Puffer	PBS 2% FCS 2mM Na-EDTA
FVS520 Lebend/tot Differenzierung	150µg FVS520 gelöst in 130µl DMSO (wasserfrei)
PBSE Lebend/tot Differenzierung (1mg/ml)	5mg PBSE gelöst in 5ml DMSO
RPMI1640 mit Zusätzen	RPMI 1640 10% FCS 1% P/S 1% L-Glu
Zellkulturmedium "Mausmedium"	RPMI 1640 10% FCS 1% P/S 2mM <i>Sodium Pyruvate</i> 0,1mM NEA 50µM 2-Mercaptoethanol

Zellkulturmedium (RMA-S)	RPMI 1640 10% FCS 1% P/S 1% L-Glu 50µM 2-Mercaptoethanol
--------------------------	--

2.1.5 Antikörper

Bei allem gelisteten Antikörpern handelt es sich um murine Antikörper. Alle Antikörper wurden vor Verwendung titriert. Dies sicherte eine möglichst hohe Auflösung bei gleichzeitiger Vermeidung eines High-Dose-Hook-Effekts (Fernando et al., 1992). Die Auswahl der zu verwendenden Verdünnung erfolgte anhand des *Separation Index* (nach (Telford et al., 2009)), Berechnung mit FlowJo):

$$Separation\ Index = \frac{MedianPositive - MedianNegative}{(84\%Negative - MedianNegative)/0.995}$$

Tabelle 6: Antikörper

Produkt	Konjugat	Klon	Verwendete Verdünnung	Hersteller
CD3e	FITC	145-2C11	1:200	BioLegend, San-Diego, CA, USA
CD19	FITC	1D3/CD19	1:800	BioLegend, San-Diego, CA, USA
Ly6G	FITC	1A8	1:400	BioLegend, San-Diego, CA, USA
CD117	PE	2B8	1:1600	BioLegend, San-Diego, CA, USA
CD122	PE/Dazzle	TM-β1	1:320	BioLegend, San-Diego, CA, USA
CD11b	bv711	M1/70	1:800	BioLegend, San-Diego, CA, USA

CD34	AF647	RAM34	1:10	BD Biosciences, Heidelberg, DE
F4/80	BB700	T45-2342	1:80	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD127	PE-Cy7	SB/199	1:40	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD49b	bv421	DX5	1:320	BD Biosciences, Heidelberg, DE
NK1.1	bv786	PK136	1:160	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD16/32	BUV395	2.4G2	1:320	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CD27	BUV737	LG.3A10	1:320	BD Biosciences, Heidelberg, DE
LY-6A/E	APC Cy7	D7	1:640	BioLegend, San-Diego, CA, USA

2.1.6 Zytokine

Tabelle 7: Zytokine

Produkt	Hersteller
<i>Mouse Recombinant</i> IL-15 (mIL-15)	Stemcell Technologies Vancouver, BC, CA

2.1.7 Zelllinien

Tabelle 8: Zelllinien

Name	Beschreibung	Spezies
RMA-S	MHC-I defiziente Lymphom-Zelllinie	Maus (<i>Mus musculus</i>)

2.1.8 Versuchstiere & Tierbedarf

Tabelle 9: verwendete Versuchstiere

Linienbezeichnung	C57BL/6J	B6.129P2S100a9tm1Nck
Tierart	Mäuse (Mus musculus)	Mäuse (Mus musculus)
Genetischer Status	(GS1) Genetisch nicht verändert	(GS2) Genetisch verändert ohne pathologischen Phänotyp
Anzahl	40	20
Genehmigung	K06/20G	K06/20G

Linienbeschreibung C57BL/6J

Die verwendeten Zuchtpaare wurden bei Charles River erworben. Für linienspezifische Details sei an dieser Stelle auf The Jackson Laboratory verwiesen (Referenz ID: 000664).

Linienbeschreibung B6.129P2S100a9tm1Nck

Prof. T. Vogl vom Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Münster stellte uns freundlicherweise die Zuchtpaare zur Verfügung. Bei der verwendeten Mauslinie B6.129P2S100a9tm1Nck handelt es sich um S100A9 defiziente Tiere mit C57BL/6 Hintergrund, nachfolgend nur als S100A9^{-/-} bezeichnet. Morphologisch ist keine Unterscheidung zwischen Wildtyp (S100A9^{+/+}), heterozygoten Genträgern (S100A9^{+/-}) und S100A9 defizienten Tieren (S100A9^{-/-}) möglich. Durch den Genknockout konnte keine Beeinträchtigung der Lebensfähigkeit, Entwicklung und Fertilität der Tiere beobachtet werden. Anzahl und Morphologie peripherer Leukozyten ist mit dem Wildtyp identisch (Manitz et al., 2003a).

Tabelle 10: Tierbedarf

Produkt	Hersteller
CO ₂	
Injektionskanüle 27 G x 3/4“	B. Braun SE, Melsungen, DE
Einmal Feindosierungsspritze 1ml	B. Braun SE, Melsungen, DE
Einmal Skalpell	B. Braun SE, Melsungen, DE
Pinzette anatomisch	Zentrallager UKT
Präparationsschere	Zentrallager UKT
Rodent Holder GC 1000	Nordion, Ottawa, ON, CA

2.1.9 Software

Tabelle 11: Software

Produkt	Hersteller
Adobe Acrobat Reader DC	Adobe Inc., San Jose, CA, USA
BD FACSDiva™	BD Biosciences, Heidelberg, DE
CorelDRAW Graphics Suite	Corel, Ottawa, ON, CA
Endnote X9	Clarivate Analytics, Boston, MA, USA
FlowJo v10	FlowJo, LCC, Ashland, OR, USA
GraphPad Prism version 9.1.2	GraphPad Software San Diego, CA, USA
Microsoft Office 2019	Microsoft Corporation Redmond, WA, USA
IBM SPSS Statistics 28.0.1	IBM, Armonk, NY, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur: RMA-S

Bei RMA-S handelt es sich um eine murine Zelllinie mit einem Defekt in der Assemblierung von MHC-I (Ljunggren et al., 1989). Hierfür ursächlich ist ein Defekt des *Transporter associated with Antigen Processing 2* (TAP2) Proteins, das am Peptidtransport vom Zytosol an die Zelloberfläche entscheidend beteiligt ist (Ossevoort et al., 1993). Diese MHC-I Defizienz qualifiziert sie als Zielzellen (*Targets*) von NK Zellen.

Nach dem Auftauen wurden die Zellen in Zellkulturmedium (siehe **Tabelle 5:** Zusammensetzung Puffer und Zellkulturmedium) aufgenommen und anschließend bei 37°C inkubiert. Aufgrund der kurzen Verdopplungszeit erfolgte alle zwei Tage ein Mediumwechsel mit Einstellung der Zellzahl auf 0,5 Mio./ml.

2.2.2 Versuchstiere

2.2.2.1 Haltung und Zucht

Die Genehmigung des Tierversuchs erfolgte am 16.11.2020 durch das Regierungspräsidium Tübingen unter der Tierversuchs-Nr. K 06/20 G. Für meine Person bestand eine Ausnahmegenehmigung nach § 16 TierSchVersV.

Die Haltung, Aufzucht und Tötung der Tiere erfolgte im FORS des Hertie Instituts für klinische Hirnforschung. Nach Bezug von Zuchtpaaren wurde eine eigene Zucht etabliert.

Verwendet wurden männliche und weibliche Tiere, die zum Analysezeitpunkt zwischen 7 und 20 Wochen alt waren. Zur Kennzeichnung erhielten alle Tiere eine Ohrlochung. Gewichtskontrollen erfolgten 3mal pro Woche. Die Überprüfung des klinischen Zustandes mit festgelegten Abbruchskriterien erfolgte täglich mittels *Scoring-Sheet*.

Futter und Wasser wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Temperatur der Haltungsräume betrug 20-24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 45 – 65%. Hell- und Dunkelphasen wechselten sich mit einer jeweiligen Dauer von 12 Stunden ab.

2.2.2.2 Übersicht Versuchsablauf K 06/20 G

Das Studiendesgin umfasste drei Gruppen:

Gruppe 1: C57BL/6J + PBS

Gruppe 2: C57BL/6J + 5-AzaC

Gruppe 3: S100A9^{-/-} + PBS

Nach initialer Bestrahlung an Tag 0 erfolgten an den Tagen 7, 10 und 14 die intraperitonealen (i.p.) Injektionen mit PBS (Gruppe 1 und 3) oder 5-AzaC (Gruppe 2). Zu den Analysezeitpunkten an Tag 7, 17, 21 und 28 wurden Mäuse zur Organentnahme und Blutgewinnung getötet. Im Schnitt wurden jeweils n = 3 Mäuse pro Analysetag getötet, so dass insgesamt 5 Durchläufe notwendig waren.

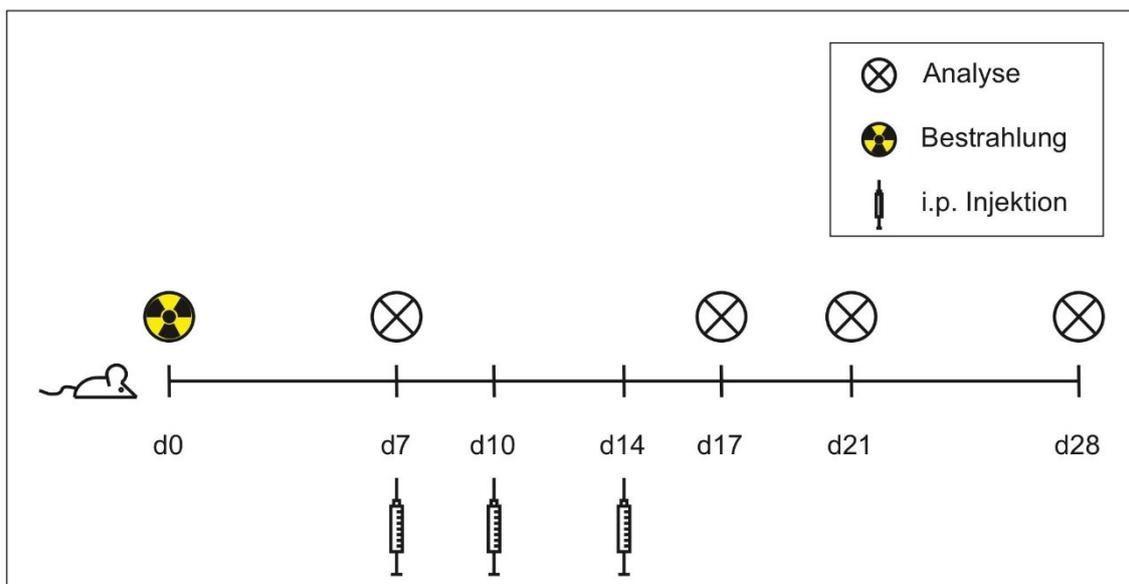


Abbildung 5: Skizze zeitlicher Ablauf

An Tag 7 wurde nur zwischen C57BL/6J und S100A9^{-/-} Tieren unterschieden, da bis zu diesem Analysezeitpunkt noch keine i.p. Injektionen erfolgten.

Um eine Vergleichbarkeit der Gruppen zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die Geschlechterverteilung aller Gruppen ähnlich ist.

Tabelle 12: Übersicht Versuchstiere

	Analysezeitpunkt				
	Tag 7	Tag 17	Tag 21	Tag 28	Anzahl
Gruppe 1	2 ♂	6 ♂	5 ♂	3 ♂	31 ♂
	3 ♀		1 ♀	2 ♀	
Gruppe 2		8 ♂	4 ♂	3 ♂	
			1 ♀	2 ♀	
Gruppe 3	2 ♂	5 ♂	4 ♂	3 ♂	14 ♂
	3 ♀		1 ♀	2 ♀	
Gesamt	4 ♂	19 ♂	13 ♂	9 ♂	45 ♂
	6 ♀		3 ♀	6 ♀	

2.2.2.3 Bestrahlung

Alle verwendeten Tiere wurden initial an Tag 0 einer subletalen Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Die Tiere wurden dafür in einen speziellen Metallzylinder (*Rodent Holder*) gesetzt und anschließend in die Bestrahlungskammer des Gerätes Gammacell Elite 1000 (MDS Nordion) gefahren. Die Bestrahlung dauerte 12 Sekunden, die Strahlendosis betrug tagesabhängig 101,1 – 102,5 cGy. Bei der eingesetzten Strahlung handelte es sich um γ -Strahlung mit Cäsium-137 als Strahlungsquelle.

Ziel der Bestrahlung war eine Synchronisierung der Hämatopoese ohne Notwendigkeit einer Stammzelltransplantation. Basierend auf den Vorarbeiten von Oelkrug und Kollegen wurde die Strahlendosis daher bewusst niedrig gewählt (Oelkrug et al., 2014).

Zur Verhinderung von Infektionen in der frühen postradiären Phase wurde dem Trinkwasser der Tiere anschließend für 14 Tage Trimethoprim (0,16mg/ml) und Sulfamethoxazol (0,8mg/ml) hinzugefügt. Die Trinkflaschen wurden 3mal wöchentlich gewechselt.

2.2.2.4 Intraperitoneale Injektion

An den Tagen 7, 10 und 14 erhielten Gruppe 1 und 3 jeweils 100µl PBS intraperitoneal. Für Gruppe 2 wurden 5mg/kg Körpergewicht 5-AzaC in einem Gesamtvolumen von 100ul PBS gelöst und anschließend i.p. appliziert. Für die Injektionen wurden sterile 27G Kanülen verwendet. Die Applikation erfolgte jeweils im Bereich des rechten unteren Quadranten des Abdomens.

2.2.2.5 Probengewinnung

Zu den genannten Analysezeitpunkten wurden Mäuse mittels CO₂ im Heimatkäfig euthanasiert. Es wurde streng darauf geachtet, dass die Euthanasie nicht im Haltungsraum durchgeführt wurde. Nach sicherer Feststellung des Todes erfolgte bei Mäusen der Gruppe 1 und 2 eine Blutentnahme durch Herzpunktion. Aus Tieren der Gruppe 3 wurde kein Blut entnommen, da eine quantitative Bestimmung von S100A8/A9 im Serum aufgrund des Genknockouts ohne Nachweis bleiben würde. Für die postmortale Herzpunktion wurde eine sterile 27G Kanüle verwendet. Nach im Anschluss durchgeführter zervikaler Dislokation wurden Milz, Femora und Tibiae entnommen.

2.2.3 Analysen

Zur Untersuchung des Einflusses von 5-AzaC auf die Konzentration des Heterodimers S100A8/A9, die NK Zell Entwicklung und die NK Zell Aktivität wurden zu jedem Analysezeitpunkt drei Teilversuche durchgeführt:

- Teilversuch 1: Einfluss von 5-AzaC auf die S100A8/A9 Konzentration im Serum: ELISA
Proben: Blut
- Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen, Makrophagen und Progenitoren: Oberflächenfärbung
Proben: Knochenmark + Milz
- Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen: Zytotoxizitätstest mittels *ivk* gegen RMA-S
Proben: Knochenmark + Milz

2.2.3.1 Teilversuch 1: Einfluss von 5-AzaC auf die S100A8/A9 Konzentration im Serum

Serumgewinnung für S100A8/A9 ELISA

Das durch Herzpunktion gewonnene Blut wurde in einem Mikroreaktionsgefäß ohne Zusätze für 30 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach erfolgter Gerinnung wurde zentrifugiert (10min x 2000 G, ohne Bremse) und der Überstand anschließend abpipettiert. Das so gewonnene Serum wurde zunächst eingefroren (-80°C) und später für ein ELISA nach Münster überführt.

S100A8/A9 ELISA

Die Arbeitsgruppe um Prof. T. Vogl am Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Münster führte die quantitative Bestimmung von S100A8/A9 im Serum mittels ELISA durch. Hierfür wurde ein von Prof. T. Vogl entwickelter muriner S100A8/A9-ELISA verwendet.

Jede Probe wurde in drei unterschiedlichen Verdünnungen gemessen; bei passenden Werten wurden diese gemittelt. War dies nicht der Fall, wurde der genannte Ablauf mit höheren oder niedrigeren Verdünnungen wiederholt.

2.2.3.2 Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen, Makrophagen und Progenitoren

Übersicht Vorgehen Teilversuch 2:

1. Herstellung einer *Single Cell Suspension* (SCS)
2. Erythrolyse
3. Oberflächenfärbung
4. Lebend/tot Differenzierung
5. Analyse am LSR II

Herstellung *Single Cell Suspension*

Knochenmark

Prinzipiell gibt es für Gewinnung von murinem KM zwei Techniken. Verwendet wurde das sog. *Crushing*, da mit dieser Technik im Rahmen eines Vorversuchs höhere Zellerträge als durch Ausspülen der Knochen (*Flushing*) erzielt werden konnten. Folgendes Vorgehen wurde gewählt (angelehnt an (Weischenfeldt and Porse, 2008)):

Nach gründlicher Entfernung von Muskeln und dem Knochen noch anhaftendem Gewebe, wurden Femora u. Tibie einzeln in einen Porzellanmörser gegeben. Nach Zugabe von Medium (RPMI 1640 + 10% FCS) wurden die Knochen mithilfe eines Stößels zerdrückt. Durch mehrmaliges Resuspendieren wurde die Lösung des Knochenmarks aus dem Knochen sichergestellt.

Die im Medium gelösten Zellen wurden anschließend aufgenommen und durch ein Zellsieb (70µm) gegeben. Zur Erhöhung der Ausbeute erfolgte im Anschluss das mehrmalige Ausspülen des Mörsers mit Medium. Im Anschluss wurde die gewonnene SCS auf Eis zwischengelagert.

Milz

Zunächst erfolgte die Entfernung von noch anhaftendem Gewebe. Anschließend wurde die Milz mit der gummierten Seite eines Spritzenkolbens (5ml) durch ein Zellsieb (70µm) gedrückt. Nach mehrmaligem Nachspülen mit Medium (RPMI 1640 + 10% FCS) wurde die entstandene SCS auf Eis zwischengelagert.

Erythrolyse

Im nächsten Schritt wurde die hergestellte SCS einer Erythrolyse unterzogen. Hierfür wurde nach erfolgter Zentrifugation (10min x 350 g) und Entfernung des Überstandes ACK *Lysing Buffer* zum verbliebenen Zellpellet hinzugegeben. Das zugegebene Volumen entsprach in etwa dem Volumen des Zellpellets. Im Anschluss wurde für 45 Sekunden unter kontinuierlichem Resuspendieren lysiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde FACS-Puffer im Überschuss (>10ml) hinzugegeben und erneut zentrifugiert (10min x 350 g). Bei erfolgreicher Erythrolyse, nachweisbar durch Entfärbung des Zellpellets, wurden die

verbliebenen Zellen lichtmikroskopisch gezählt und in Zellkulturmedium aufgenommen. Bei unvollständiger Erythrolyse, sprich bei weiterhin rötlichem Zellpellet, wurde erneut für 45 Sekunden lysiert.

Oberflächenfärbung

Für die Oberflächenfärbung wurden jeweils 2 Mio. Zellen der SCS in FACS-Puffer aufgenommen (Konzentration: 5 Mio. Zellen/ml). In einer 96-Well Platte wurden dann jeweils 2 Reihen (*stained* und *unstained*) mit 1 Mio. Zellen pro *Well* angelegt.

Nach Zentrifugation der 96-Well Platte (5min x 400 G) und anschließendem Abschütten des Überstandes wurden entweder 50µl des Antikörper-Cocktails (*stained*, siehe **Tabelle 6:** Antikörper) oder 50µl FACS-Puffer (*unstained*) hinzugeben. Die Inkubation erfolgte für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurde mit FACS-Puffer auf 200µl aufgefüllt und zweimal mit PBS gewaschen.

Lebend/tot Differenzierung

Der hier verwendete lebend/tot Farbstoff (FVS520) wurde nach demselben Prinzip wie die Oberflächen Antikörper titriert (siehe 2.1.5).

Tabelle 13: Titration FVS520

Bezeichnung	Verdünnung Stocklösung laut Herstellerangabe	Verwendete Verdünnung Stocklösung
FVS 520 (BD)	1:1000	1:4000

Nach Aufnahme der Zellen in 200µl PBS erfolgte die Lebend/tot Differenzierung durch Markierung avitaler Zellen. Hierfür wurde die lebend/tot Differenzierungs-Stocklösung zunächst 1:100 mit DMSO verdünnt und anschließend im Verhältnis 1:40 hinzugegeben (Gesamtverdünnung Stocklösung 1:4.000).

Inkubiert wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurde zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von

FACS-Fix (1% FA) für eine spätere Messung fixiert und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

Durchflusszytometrie und Auswertung

Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer LSR II (BD). Aufgrund der Verwendung eines mehrfarbigen *Panel*s wurde initial kompensiert. Hierfür wurden UltraComp eBeads (Thermo Fisher) jeweils einzeln mit den verwendeten Antikörpern gefärbt und als einfarbige Kompensationskontrolle verwendet. Inkubationszeiten und Waschschrte waren identisch mit denen der Oberflächenfärbung.

Gating-Strategie

Pregating

Für eine Vorauswahl (= *Pregating*) der Rohdaten wurde stets dieselbe, hierarchisch aufgebaute Vorgehensweise gewählt. Nach einer zweifachen Dubletten Entfernung wurde in der Auftragung von *Forward Scatter Area* (FSC-A) gegen *Sideward Scatter Area* (SSC-A) ein weitgefasstes Gate gelegt, welches lediglich Zelldebris exkludierte.

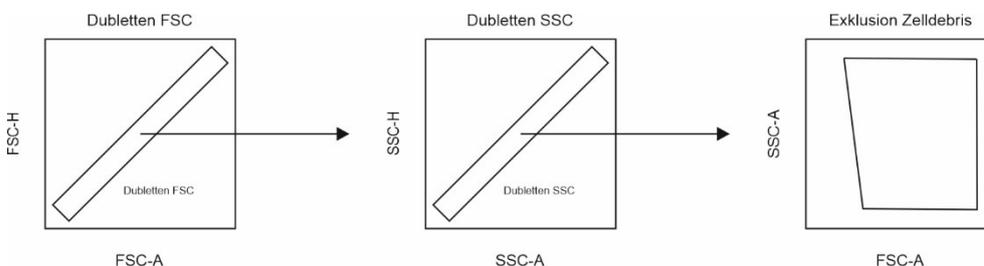


Abbildung 6: *Pregating* Rohdaten

Gating hämatopoetische Vorläuferzellen

Hämatopoetische Vorläuferzellen wurden über folgenden Zelloberflächenphänotyp definiert:

Lymphoide Reihe (Kondo et al., 1997a)

Common Lymphoid Progenitors (CLPs) $\text{lin}^- \text{CD127}^+ \text{Sca-1}^+ \text{CD117}^+$

Myeloische Reihe (Akashi et al., 2000)

Common Myeloid Progenitors (CMPs) $\text{lin}^- \text{CD127}^- \text{Sca-1}^- \text{CD117}^+$

$\text{CD34}^+ \text{CD16/32}^-$

Granulocyte-Monocyte Progenitors (GMPs) $\text{lin}^- \text{CD127}^- \text{Sca-1}^- \text{CD117}^+$

$\text{CD34}^- \text{CD16/32}^-$

Megakaryocyte-Erythroid Progenitors (MEPs) $\text{lin}^- \text{CD127}^- \text{Sca-1}^- \text{CD117}^+$

$\text{CD34}^+ \text{CD16/32}^+$

Die Auswahl abstammungsnegativer Zellen (lin^-) erfolgte durch negative Selektion. Hierfür wurden Antikörper, die alle mit dem FITC Fluorochrom konjugiert waren, gegen CD3 (T-Lymphozyten), CD19 (B-Lymphozyten) und *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D* (Ly6G, Neutrophile) verwendet. Im gleichen Zug erfolgte die negative Selektion avitaler Zellen durch das ebenfalls im FITC-Kanal detektierte FVS520.

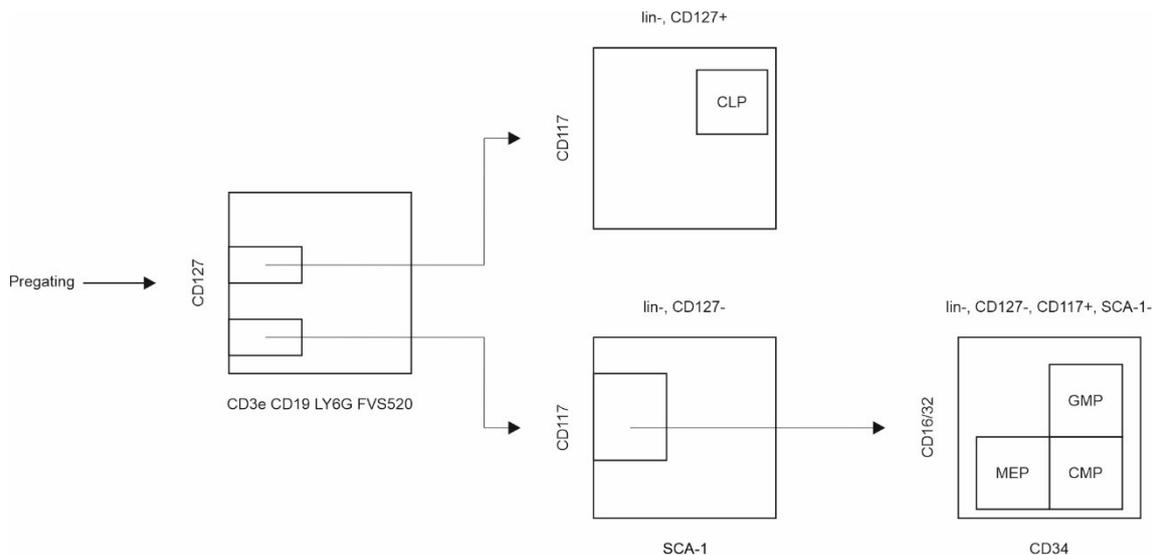


Abbildung 7: Gating hämatopoetischer Vorläuferzellen
Angelehnt an (Challen et al., 2009)

NK Zell Gating

Um die NK Zell Entwicklung zu untersuchen, wurden in einem ersten Schritt alle vitalen, abstammungsnegativen (lin^{-}), CD122 und NK1.1 exprimierenden Zellen selektiert. Eingeschlossen wurden folglich *immature* NK Zellen (iNK) sowie alle sich anschließenden Entwicklungsstufen (Kim et al., 2002).

Als Marker für mNKs wurde CD49b (DX5) herangezogen (Kim et al., 2002).

Zur Untersuchung der funktionellen NK Zellreifung wurde die Oberflächenexpression von CD27 gegen die von CD11b aufgetragen. Es folgte eine Unterteilung in vier Entwicklungsstufen (Chiossone et al., 2009):

1. $CD11b^{low}CD27^{low}$ (doppelt negativ, DN)
2. $CD11b^{low}CD27^{high}$ ($CD11b^{low}$)
3. $CD11b^{high}CD27^{high}$ (doppelt positiv, DP)
4. $CD11b^{high}CD27^{low}$ ($CD27^{low}$)

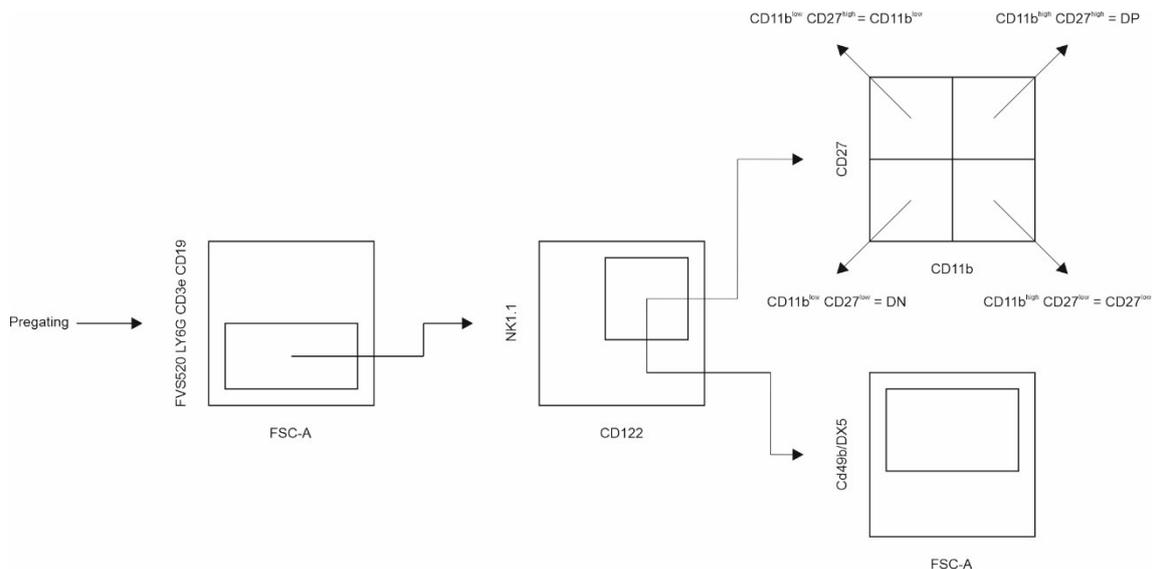


Abbildung 8: NK Zellen Gating
Gating angelehnt an (Chiossone et al., 2009)

Die Reifung von NK Zellen erfolgt physiologischerweise in sekundären lymphatischen Organen und wäre unter normalen Bedingungen im KM nicht zu beobachten (Yu et al., 2013). Um zu prüfen, ob eine mögliche Reifung von NK Zellen unter Inflammationsbedingungen oder nach 5-AzaC Behandlung auch im

KM stattfindet, wurde oben genanntes Vorgehen sowohl für Milz als auch für KM angewendet.

Monozyten/Makrophagen und weiteres Gating

Nach erfolgtem Ausschluss abstammungspositiver, avitaler Zellen wurden reife Makrophagen und Monozyten über Expression des Oberflächenmarkers F4/80 detektiert (McKnight et al., 1996, Francke et al., 2011).

Um weitere Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu erkennen, wurde zudem die Expression aller verwendeten Oberflächenmarker einzeln gegen FSC-A aufgetragen.

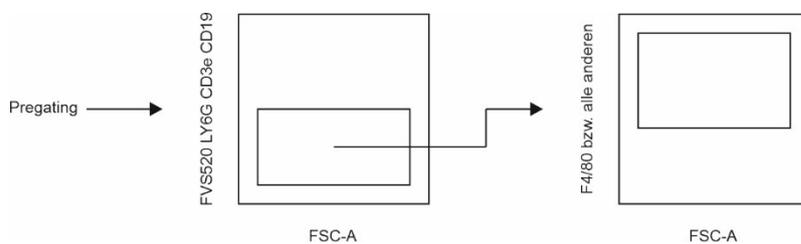


Abbildung 9: Makrophagen und weiteres *Gating*

2.2.3.3 Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen

Als Parameter für die Aktivität der NK Zellen (im Folgenden als „Effektoren; E“ bezeichnet) wurde ihre Fähigkeit zur Lyse der Zelllinie RMA-S (im Folgenden als „Targets; T“ bezeichnet) gewählt.

Übersicht Vorgehen Teilversuch 3:

Tag 1:

1. Herstellung einer *single cell suspension* (SCS)
2. Erythrolyse
3. Aktivierung der NK Zellen
4. CFDA-SE Färbung RMA-S

Tag 2:

1. Vorbereitung der *Targets*
2. Vorbereitung der Effektoren
3. Anlegen des ivk
4. Lebend/tot Differenzierung

Tag 1

Herstellen einer Single Cell Suspension

Identisch zu Vorgehen in Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen und Progenitoren.

Erythrolyse

Identisch zu Vorgehen in Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen Makrophagen und Progenitoren.

Aktivierung der Effektoren

Da murine NK Zellen ohne vorangegangene Aktivierung nur geringe Zytotoxizität gegen Zielzellen aufweisen, erfolgte eine Aktivierung. Um möglichst viele vitale NK Zellen zu erhalten, die GZMB (kodiert für Granzym B) und PRF1 (kodiert für Perforin-1) exprimieren, entschieden wir uns für mL-15 als Aktivator (Cooper et al., 2002, Fehniger et al., 2007).

Hierfür wurden nach erfolgter Erythrolyse jeweils 25 Mio. Zellen der SCS in Mausmedium aufgenommen. Die Konzentration betrug dabei 10 Mio. Zellen/ml. Um eine optimale Aktivierung der NK Zellen zu gewährleisten, wurden 100ng/ml mL-15 hinzugegeben und anschließend bei 37°C in einer 12-Well Platte inkubiert. Um hohe Aktivitätsgrade bei gleichzeitig niedriger Zelltodfrequenz zu realisieren, wurde die Inkubationsdauer auf 18-20 Stunden festgesetzt (Fehniger et al., 2007).

CFDA-SE Färbung RMA-S

Zur Markierung der *Targets* wurde der zellpermeable Tracer CFDA-SE verwendet. Nach Diffusion durch die Zellmembran spalten intrazelluläre Esterasen Acetatgruppen ab, wodurch Carboxyfluorescein-Succinimidyl-Ester

(CFSE) entsteht. Dies bindet über seine Succinimidyl Gruppe kovalent an intrazelluläre Moleküle (Parish, 1999) und wird bei Zellteilung zu gleichen Teilen an die beiden entstehenden Tochterzellen weitergegeben (Lyons and Parish, 1994).

Im ersten Schritt wurden 10 Mio. RMA-S Zellen in 1ml PBS aufgenommen. Um die gewünschte CFDA-SE Zielkonzentration von $0,5\mu\text{M}$ zu erreichen, wurde die 10mM Stocklösung zunächst in zwei Schritten mit PBS auf eine Konzentration von $1\mu\text{M}$ verdünnt. Im Anschluss wurde 1ml der $1\mu\text{M}$ Lösung im Verhältnis 1:1 mit den RMA-S Zellen in PBS gemischt.

Nach einer 15-minütigen Inkubationszeit bei 37°C wurden 3ml kaltes (4°C) FCS zugegeben und die Zellen 2 Minuten bei RT stehen gelassen. Anschließend wurde mit Zellkulturmedium (RMA-S) auf 10ml aufgefüllt und zentrifugiert (10min x 350 G). Im nächsten Schritt wurden die Zellen in Zellkulturmedium aufgenommen (0,5 Mio./ml) und über Nacht in den Brutschrank gestellt.

Tag 2

Vorbereitung der *Targets* (RMA-S)

Um eine möglichst niedrige Spontantodfrequenz zu realisieren, wurde vor dem Anlegen des ivk eine Dichtegradienten-Zentrifugation (Biocoll[®] = Ficoll[®] Derivat) durchgeführt.

Die RMA-S Zellen in Medium wurden aus der *6-Well* Platte aufgenommen und vorsichtig auf 10ml des bereits vorgelegten Polymers geschichtet. Dann wurde für 20 Minuten zentrifugiert (500G, Beschleunigung und Bremse 3/9). Während sich vitale Zellen danach in der Interphase wiederfinden ließen, sedimentierten avitale Zellen aufgrund ihrer höheren Dichte während der Zentrifugation und konnten so entfernt werden (Tulp and Bont, 1975).

Nach Aufnahme der vitalen Interphase Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und anschließend in Mausmedium mit 100ng/ml mL-15 überführt. Die eingestellte Konzentration betrug dabei 1 Mio./ml.

Vorbereitung der Effektoren

Nach frühestens 18h Inkubationszeit wurden die Effektoren gezählt und 10 Mio. Zellen in frisches Mausmedium mit 100ng/ml mL-15 überführt. Dabei wurde eine Konzentration von 5 Mio. Zellen/ml eingestellt.

Anlegen des *in vitro* kills

Für KM und Milz wurden jeweils drei verschiedene Effektor – *Target* (E:T) Verhältnisse gewählt. Aufgrund der Entscheidung, auf eine Isolation der NK Zellen zu verzichten, wurden die E:T Verhältnisse bewusst hoch angesetzt (50:1, 100:1, 500:1). Unter Berücksichtigung der von uns gemessenen NK Zell Frequenzen von ca. 2-3% in der Milz und 1-2% im KM waren die tatsächlichen E:T Verhältnisse (Verhältnis von NK Zellen zu RMA-S) deutlich niedriger.

Um später einen Mittelwert bilden zu können, wurden für jedes E:T Verhältnis drei Ansätze (= Triplet) angelegt.

Die Anzahl der *Targets* betrug in allen Ansätzen 5.000. Die E:T Verhältnisse 50:1 und 100:1 wurden jeweils mit Mausmedium (mIL-15) auf 200µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Ansätze der E:T Verhältnisse 500:1 wurden aufgrund ihres höheren Gesamtvolumens (505µl) in einer 48-Well Platte inkubiert. Zur Ermittlung der Spontanodfrequenz wurden zudem 5 Ansätze („Monos“) ohne Effektoren angelegt. Auch hier wurde mit IL-15 versetztes Mausmedium zum Auffüllen verwendet.

Die Reihenfolge beim Pipettieren war dabei stets dieselbe. Zunächst wurden die Effektoren vorgelegt, anschließend wurde mit Mausmedium aufgefüllt, bevor im letzten Schritt die *Targets* hinzugegeben wurden. Nach gründlichem, blasenfreiem Resuspendieren begann die Inkubationszeit von 5 Stunden bei 37°C.

Tabelle 14: Pipettieren eines Zytotoxizitätstests mittels ivk

E:T	Maus Zellen	Targets	Mausmedium + mL-15	Well
50:1	250.000 (50µl)	5000 (5µl)	145µl	96-Well
100:1	500.000 (100µl)	5000 (5µl)	95µl	96-Well
500:1	2.500.000 (500µl)	5000 (5µl)	X	48-Well
Monos		100.000 (100µl)	100µl	96-Well
E:T = Effektor – Target Verhältnis				

Lebend/tot Differenzierung

Im Anschluss an die Inkubation erfolgte die Lebend/tot Differenzierung. Hierfür wurden abgestorbene Zellen mit PBSE gefärbt.

Im ersten Schritt wurden die 500:1 Ansätze in eine 96-Well Platte überführt.

Um die gewünschte Endkonzentration von PBSE von 0,5µg/ml zu erreichen, wurde die Stocklösung (5mg/ml) anschließend in zwei Schritten verdünnt (1:10 mit DMSO, dann 1:200 mit PBS). Zu jedem Ansatz wurden dann 200µl der verdünnten Stocklösung hinzugefügt und für 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen im Anschluss in 100µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Fixierung erfolgte durch die Zugabe von 100µl FACS-Fix.

Durchflusszytometrie und Auswertung

Die Messung erfolgte mittels Durchflusszytometer FACS Canto II. *Targets* konnten anhand ihrer CFSE-Expression identifiziert werden. Durch die Positivität für PBSE konnte zwischen vitalen (PBSE negativ) und avitalen (PBSE positiv) Zellen unterschieden und die Frequenz der avitalen Zellen berechnet werden.

$$avitale\ Targets\ (\%) = \frac{(Targets_{CFSE^+ + PBSE^+})}{(Targets_{CFSE^+})} \times 100$$

Mithilfe der Spontanoddfrequenz, die als Durchschnitt der Prozentsätze avitaler Zellen aus den fünf Ansätze ohne Effektoren („Monos“) berechnet wurde, konnte im nächsten Schritt die NK Zell spezifische Lyserate („spezifischer *Kill*“) ermittelt werden:

$$\text{spez. Kill (\%)} = \frac{(\text{avitale Targets (\%)} - \text{Spontanoddfrequenz (\%)})}{(100\% - \text{Spontanoddfrequenz (\%)})} \times 100$$

Von den jeweiligen Triplets wurde im Anschluss der arithmetische Mittelwert des spezifischen *Kills* berechnet.

2.2.4 Auswertung und Statistik

Für die statistische Auswertung wurden GraphPad Prism (9.1.2) und IBM SPSS Statistics (28.0.1) verwendet. Alle Graphiken wurden mit GraphPad Prism erstellt. Als signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ gewertet. Falls nicht anders angegeben, werden der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung (σ) sowie die Signifikanz angegeben.

Initial erfolgte unabhängig von der Anzahl der zu vergleichenden Gruppen eine Überprüfung auf Normalverteilung. Hierfür wurde der Shapiro-Wilk-Test verwendet. Bei nicht gegebener Normalverteilung und zwei zu vergleichenden Gruppen wurde ein Mann-Whitney-U-Test als nichtparametrisches Äquivalent durchgeführt. Bei drei Gruppen erfolgte die globale Varianzanalyse in diesem Fall mittels Kruskal-Wallis Test. Zur *post-hoc* Analyse wurde ein Dunn-Bonferroni Test verwendet.

Bei gegebener Normalverteilung der Messwerte wurde anschließend auf Varianzhomogenität geprüft (Levene-Test). Waren zwei Gruppen zu vergleichen und lag Varianzhomogenität vor (Levene-Test mit $p > 0.05$), wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt. Lag ein signifikanter Unterschied der Varianzen vor (Levene Test mit $p < .05$), wurde auf einen Welch's t-Test ausgewichen. Im Fall von drei zu vergleichenden Gruppen mit Varianzhomogenität wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Für den anschließenden paarweisen Vergleich (*post-hoc*) wurde hier ein Tukey multiple Comparison Test

verwendet. Bei fehlender Varianzhomogenität wurde die Welch-Anova angewandt. Als *post-hoc* Test wurde dann ein Games-Howell Test durchgeführt.

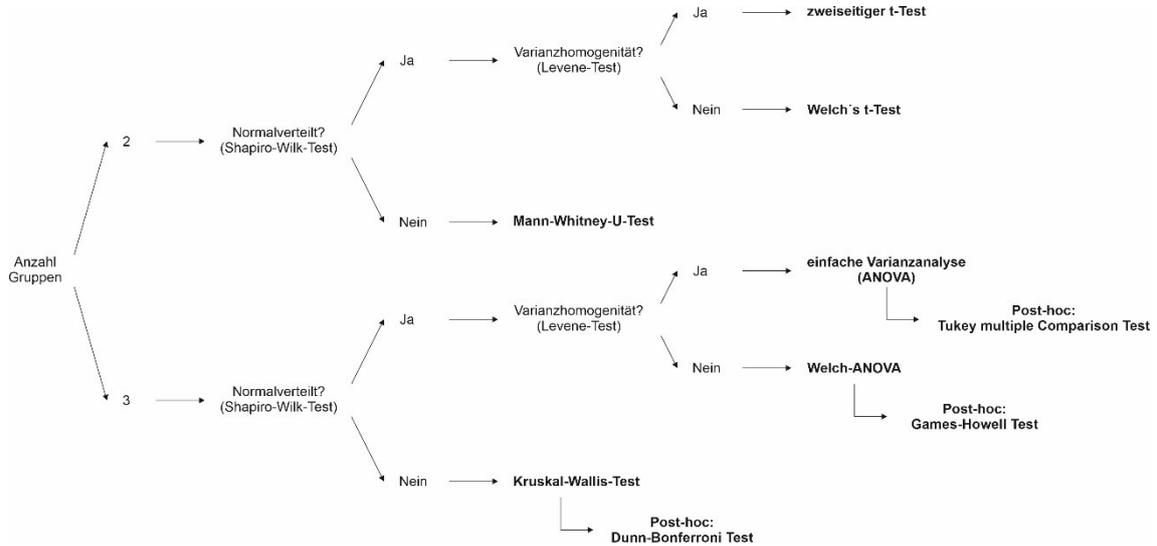


Abbildung 10: Vorgehen statistische Auswertung

3. Ergebnisse

3.1 Teilversuch 1: Einfluss von 5-AzaC auf die S100A8/A9 Konzentration im Serum

3.1.1 Inflammationsreaktion an Tag 17, 21 und 28

Um die existierenden *in vitro* Daten *in vivo* zu bestätigen und die vermutete Kausalität zwischen einer niedrigdosierten 5-AzaC Behandlung und einer gesteigerten Expression von S100A8/A9 zu belegen, wurde die Konzentration von S100A8/A9 im Serum von C57BL/6J Mäusen, die niedrigdosiert mit 5-AzaC behandelt wurden, an den Tagen 17, 21 und 28 nach subletaler Bestrahlung gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch ELISA-Analyse des Serumüberstandes der Tiere. Die Ergebnisse wurden mit einer Kontrollgruppe von C57BL/6J Mäusen verglichen, die zu den entsprechenden Zeitpunkten PBS injiziert bekommen hatten.

An Tag 17 nach Bestrahlung wurden in Serumproben der mit 5-AzaC behandelten Mäuse (Gruppe 2 C57BL/6J + 5-AzaC) höhere S100A8/A9 Konzentrationen als in Serumproben der mit PBS behandelten Mäuse (Gruppe 1 C57BL/6J + PBS) gemessen. Der Unterschied war nicht signifikant ($p = .0634$). Für beide Gruppen werden die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) und Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ($M1 = 208.4 \pm 20,49\text{ng/ml}$; $M2 = 330.3 \pm 111,62 \text{ ng/ml}$) dargestellt.

An Tag 21 nach Bestrahlung fanden sich in beiden untersuchten Gruppen höhere Konzentrationen von S100A8/A9 als an Tag 17. Serumproben der mit 5-AzaC behandelten Mäuse (Gruppe 2 C57BL/6J + 5AzaC) zeigten höhere S100A8/A9 Konzentrationen als Serumproben der mit PBS behandelten Mäuse (Gruppe 1 C57BL/6J + PBS). Der Unterschied war nicht signifikant ($p = .304$). Für beide Gruppen werden die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) und Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ($M1 = 563.8 \pm 309.78\text{ng/ml}$; $M2 = 826.6 \pm 436.87\text{ng/ml}$) dargestellt.

An Tag 28 nach Bestrahlung wurden in Serumproben der mit 5-AzaC behandelten Mäuse (Gruppe 2 C57BL/6J + 5-AzaC) signifikant niedrigere S100A8/A9 Konzentrationen als in Serumproben der mit PBS behandelten Mäuse (Gruppe 1 C57BL/6J + PBS) gemessen ($p = .0441$). Für beide Gruppen werden die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) und Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ($M1 = 647.1 \pm 359.60\text{ng/ml}$; $M2 = 187.6\text{ng/ml} \pm 89.93\text{ng/ml}$) dargestellt.

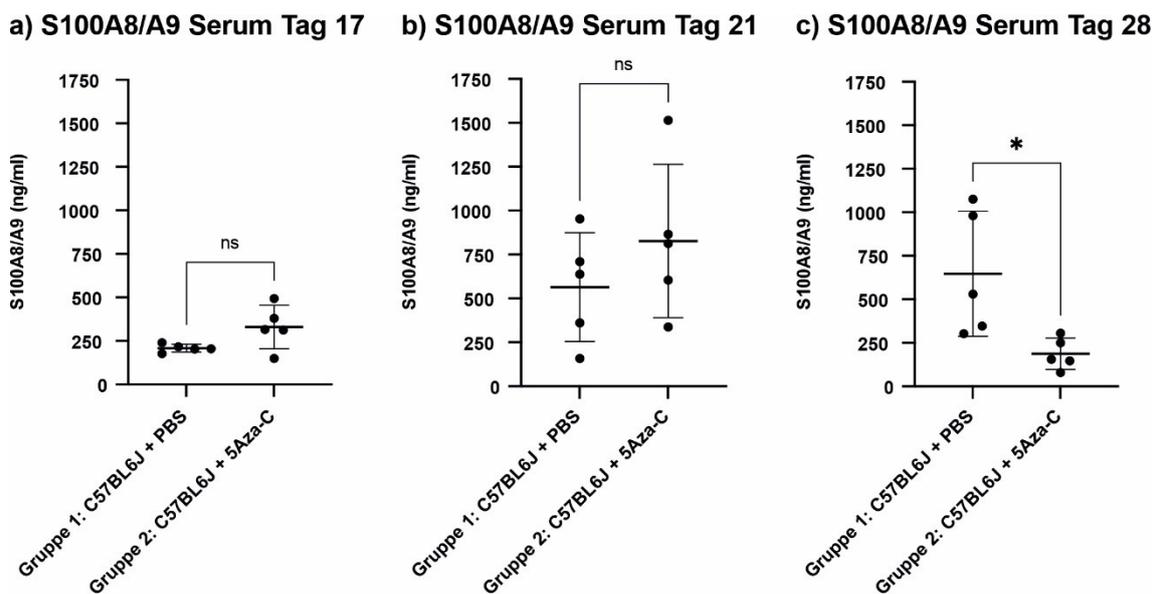


Abbildung 11: Serumkonzentration von S100A8/A9 im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution x-Achse: jeweils Darstellung der mit PBS behandelten Kontrollgruppe „Gruppe 1: C57BL/6J + PBS“ (links) und der mit 5Aza-C behandelten Versuchsgruppe „Gruppe 2: C57BL/6J + 5-AzaC (rechts). y-Achse: Mittels ELISA bestimmte S100A8/A9 Serumkonzentration in (ng/ml) $n = 5$ Mäuse pro Gruppe

- a) S100A8/A9 Serum Tag 17: ungepaarter t-Test
- b) S100A8/A9 Serum Tag 21: ungepaarter t-Test
- c) S100A8/A9 Serum Tag 28: Welch's t-Test

3.1.2 Kinetik der S100A8/A9-vermittelten Inflammationsreaktion

Die durchgeführten kinetischen Analysen zeigen, dass eine subletale Bestrahlung zu einer systemischen Inflammationsreaktion führt, welche sich durch einen S100A9 Anstieg im Serum quantifizieren lässt. Sowohl in Serumproben der mit 5-AzaC behandelten Tiere als auch in den Serumproben der Kontrollgruppe kam es initial zu einem Anstieg der S100A8/A9 Serumkonzentrationen von Tag 17 auf Tag 21 im Sinne einer frühen Inflammationsreaktion. In den mit 5-AzaC epigenetisch modulierten Tieren fanden sich zu beiden Zeitpunkten höhere S100A8/A9 Konzentrationen als in den

mit PBS behandelten Tieren. In Gruppe 1 konnte an Tag 28 eine weitere Zunahme der Konzentration der S100A8/A9 Serumkonzentration beobachtet werden. In Gruppe 2 kam es zu einer Umkehr der Dynamik mit Abfall der S100A8/A9 Serumkonzentration. Die gemessenen S100A8/A9 Serum Werte waren zu diesem Zeitpunkt signifikant niedriger als in Gruppe 1. Dargestellt wurden jeweils für jeden Untersuchungszeitpunkt die Mittelwerte und Standardabweichungen (siehe oben) von Gruppe 1 und 2 (jeweils n = 5).

Verlauf S100A8/A9 Expression

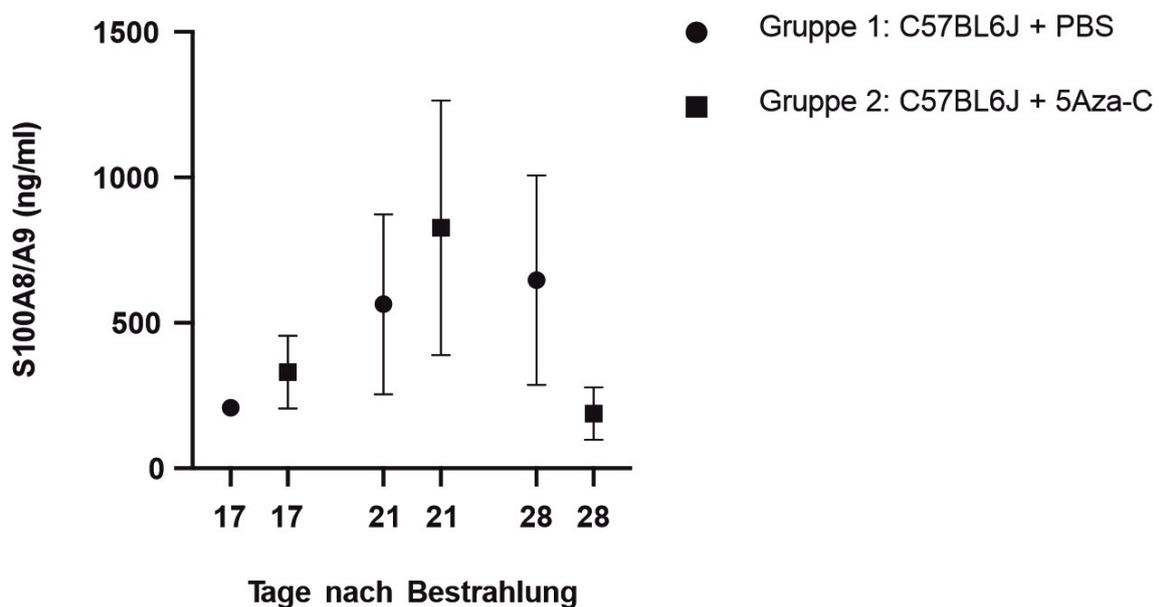


Abbildung 12: Kinetik der Inflammationsreaktion als Verlauf der S100A8/A9 Serumkonzentration x-Achse: Tage nach initialer Bestrahlung: Für jeden Analysezeitpunkt Darstellung der mit PBS behandelten Kontrollgruppe „Gruppe 1: C57BL/6J + PBS“ (links) und der mit 5-AzaC behandelten Versuchsgruppe „Gruppe 2: C57BL/6J + 5Aza-C (rechts). y-Achse: Mittels ELISA bestimmte S100A8/A9 Serumkonzentration in (ng/ml).

3.2 Teilversuch 2: Phänotyp Analyse NK Zellen, Makrophagen und Progenitoren

3.2.1 NK Zell Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

Um die Auswirkungen von 5-AzaC sowie den Einfluss des Fehlens von S100A8/A9 Proteinen auf die frühe Regeneration der NK Zellen nach subletaler

Bestrahlung zu untersuchen, erfolgte die Bestimmung der NK Zellfrequenz. An den Tagen 7, 17, 21 und 28 nach der Strahlenexposition wurde hierfür die Frequenz von $\text{lin}^- \text{CD122}^+ \text{NK1.1}^+$ Zellen relativ zu allen lin^- Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

An Tag 7 war die NK Zell Frequenz in Mäusen der Linie C57BL/6J signifikant höher als in S100A9^{-/-} Mäusen ($p = .0165$). Für beide Gruppen wurden die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) und Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ($M1 = 2.59 \pm 1.13\%$; $M2 = 0.63 \pm 0.22\%$) dargestellt.

An Tag 17 konnte gezeigt werden, dass ein signifikanter Unterschied in der NK Zell Frequenz im KM besteht ($p = .035$). Die mit 5-AzaC behandelte Gruppe 2 zeigte signifikant höhere NK Zell Frequenzen als die mit behandelte Gruppe 1 ($p = .038$). Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen Gruppe 2 und 3 ($p = .852$) sowie zwischen Gruppe 1 und 3 gefunden ($p = .0976$). Für alle Gruppen wurden die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) und Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ($M1 = 0.72 \pm 0,25\%$; $M2 = 1.42 \pm 0,50\%$, $M3 = 1.29 \pm 0,39\%$) dargestellt.

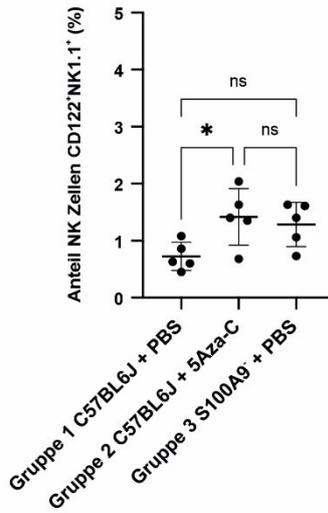
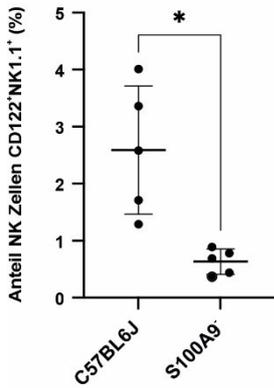
An Tag 21 bestand ein signifikanter Unterschied der NK Zell Frequenz im KM ($p = .0087$). Tiere der Gruppe 1 ($p = .0201$) und Gruppe 2 ($p = .0136$) zeigten signifikant niedrigere NK Zell Frequenzen als S100A9^{-/-} Mäuse der Gruppe 3. Zwischen den Gruppen 1 und 2 konnte kein signifikanter Unterschied gezeigt werden ($p = .974$).

An Tag 28 konnte kein signifikanter Unterschied in der Frequenz der NK Zellen zwischen den Gruppen nachgewiesen werden ($p = .117$). In allen drei Gruppen kam es im Vergleich zu Tag 21 zu einer leichten Zunahme der NK Zell Frequenz ($M1 = 1.59 \pm 0.06$; $M2 = 1.16 \pm 0.42$; $M3 = 1.73 \pm 0.41$).

Für alle Gruppen wurden die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) und Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung ($M1 = 1.18 \pm 0.31\%$; $M2 = 1.15 \pm 0.15\%$, $M3 = 1.69 \pm 0.25\%$) dargestellt.

a) Tag 7 NK Zellfrequenz KM

b) Tag 17 NK Zellfrequenz KM



c) Tag 21 NK Zellfrequenz KM

d) Tag 28 NK Zellfrequenz KM

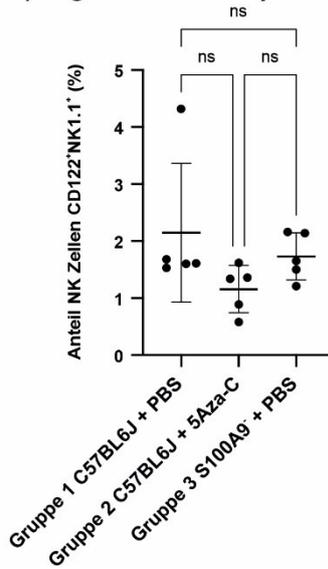
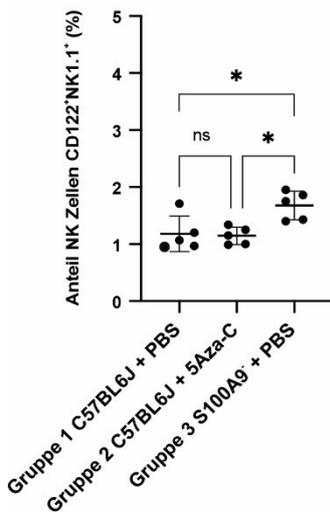


Abbildung 13: NK Zell Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)
b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).
y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten NK Zell Frequenz (definiert als lin⁻ CD122⁺NK1.1⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle lin⁻ Zellen.
a) Tag 7 NK Zellfrequenz KM: Welch's t-Test
b) Tag 17 NK Zellfrequenz KM: ANOVA
c) Tag 21 NK Zellfrequenz KM: ANOVA
d) Tag 28 NK Zellfrequenz KM: Welch ANOVA

3.2.2 NK Zell Regeneration während der frühen hämatopoetischen

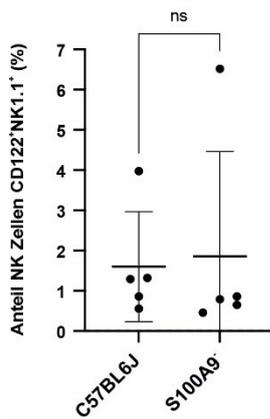
Rekonstitution: Milz

Bei der Untersuchung des Milzgewebes konnte zu keinem der vier Analysezeitpunkte ein signifikanter Unterschied in der Frequenz von NK Zellen festgestellt werden. Bei Betrachtung der Kinetik der NK Zellregeneration nach subletaler Bestrahlung fällt jedoch auf, dass in der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere bereits an Tag 17 hochnormale NK Zellfrequenzen zu beobachten sind, während dies in der Kontrollgruppe und in der Knockoutgruppe erst zu späteren Zeitpunkten der Fall ist.

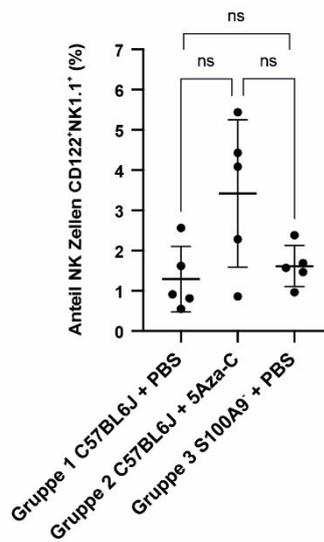
Zudem wurden die höchsten Frequenzen an CD122⁺NK1.1⁺ exprimierenden Zellen relativ zu allen lin⁻ Zellen an den Tagen 17 ($p = .0589$, M1 = $1.29 \pm 0.81\%$, M2 = $3.42 \pm 1.83\%$, M3 = $1.62 \pm 0.51\%$), 21 ($p = .692$, M1 = 2.08 ± 1.15 , M2 = 2.65 ± 1.54 , M3 = 2.60 ± 0.51) und 28 ($p = .648$, M1 = 2.80 ± 0.44 , M2 = 2.97 ± 0.81 , M3 = 2.60 ± 0.51) in der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tieren beobachtet.

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

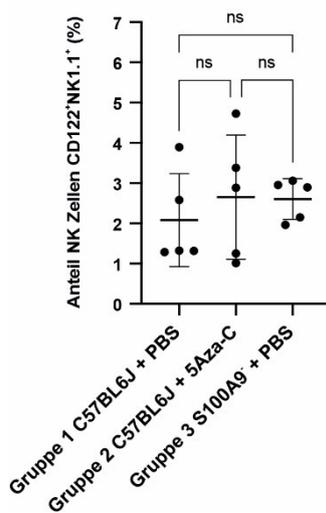
a) Tag 7 NK Zellfrequenz Milz



b) Tag 17 NK Zellfrequenz Milz



c) Tag 21 NK Zellfrequenz Milz



d) Tag 28 NK Zellfrequenz Milz

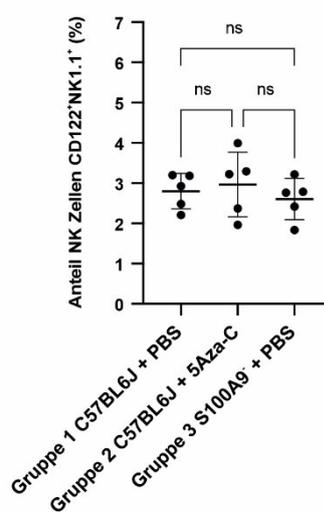


Abbildung 14: NK Zell Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)
b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C“ (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).
y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten NK Zell Frequenz (definiert als lin⁻CD122⁺NK1.1⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle lin⁻ Zellen
a) Tag 7 NK Zellfrequenz Milz: Mann-Whitney Test
b) Tag 17 NK Zellfrequenz Milz: Welch ANOVA
c) Tag 21 NK Zellfrequenz Milz: ANOVA
d) Tag 28 NK Zellfrequenz Milz: ANOVA

3.2.3 NK Zell Reifung während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

Zur Bestimmung des Anteils von mNK und den darauffolgenden Reifestufen unter allen NK Zellen wurde der Anteil von CD49b exprimierenden NK Zellen unter allen CD122⁺NK1.1⁺ exprimierenden Zellen ermittelt.

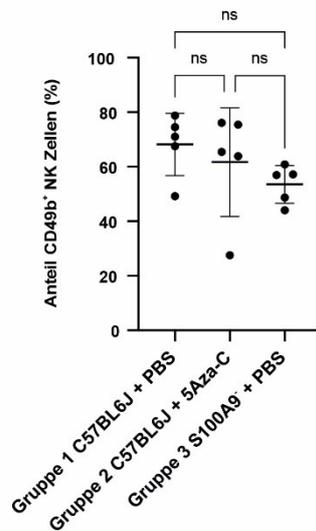
Für Tag 7 war aufgrund eines Gerätefehlers bei der Durchflusszytometrie welcher zu Probenverlust und folglich zu geringer Zellzahl führte, keine statistische Auswertung möglich. An Tag 17 ($p = .0958$, $M1 = 68.23 \pm 11.44\%$, $M2 = 61.68 \pm 19.90\%$, $M3 = 53.54 \pm 6.95\%$) und 21 ($p = .0691$, $M1 = 35.52 \pm 23.91\%$, $M2 = 62.09 \pm 6.99\%$, $M3 = 44.65 \pm 13.85\%$) konnte zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied im Anteil CD49b exprimierender NK Zellen nachgewiesen werden.

An Tag 28 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = .0437$). In Gruppe 2 war der Anteil von mNK und den nachfolgenden Reifestufen unter allen NK Zellen signifikant niedriger als in der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere ($p = .0441$). Sowohl zwischen der Kontrollgruppe und den S100A8/A9 defizienten Tieren der Gruppe 3 ($p = .802$) als auch zwischen Gruppe 2 und 3 ($p = .131$) konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

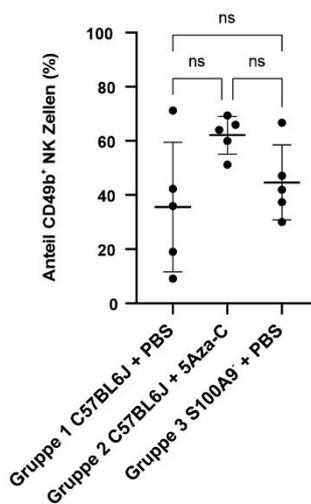
Im Knochenmark zeigte sich von Tag 17 auf Tag 21/Tag 28 keine konsekutive Zunahme des Anteils reifer NK Zell Entwicklungsstufen. Es konnte zudem weder ein positiver Effekt von 5-AzaC auf die frühe Ausreifung von NK Zellen nach subletaler Bestrahlung noch ein negativer Effekt bei S100A8/A9 Gen *Knockout* gezeigt werden.

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

a) Tag 17 CD49b Expression NK Zellen KM



b) Tag 21 CD49b Expression NK Zellen KM



c) Tag 28 CD49b Expression NK Zellen KM

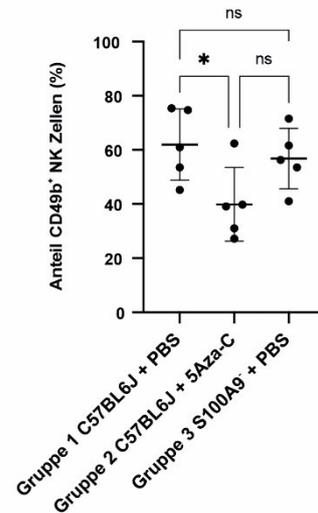


Abbildung 15: NK Zell Reifung im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark
x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).
y-Achse: Prozentuale Darstellung des Anteils von NK Zellen, die CD49b exprimieren (lin⁻ CD122⁺ NK1.1⁺ CD49b⁺), gemessen mittels Durchflusszytometrie, relativ zu allen NK Zellen (lin⁻ CD122⁺ NK1.1⁺ CD49b^{+/-}).
a) Tag 17 CD49b Expression NK Zellen KM: Kruskal-Wallis Test
b) Tag 21 CD49b Expression NK Zellen KM: ANOVA
c) Tag 28 CD49b Expression NK Zellen KM: ANOVA

3.2.4 NK Zell Reifung während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

An Tag 7 konnte kein signifikanter Unterschied in der CD49b Expression zwischen den Gruppen und somit auch kein signifikanter Unterschied im Anteil reifer NK Zellen an allen NK Zellen ($p = .222$) festgestellt werden.

An Tag 17 wiesen die mit 5-AzaC epigenetisch modulierten Tiere die höchsten Anteile von mNK an allen NK Zellen auf. Der Unterschied zwischen den Gruppen war zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant ($p = .470$, $M1 = 50.89 \pm 24.77\%$, $M2 = 66.37 \pm 24.04\%$, $M3 = 50.65 \pm 17.97\%$).

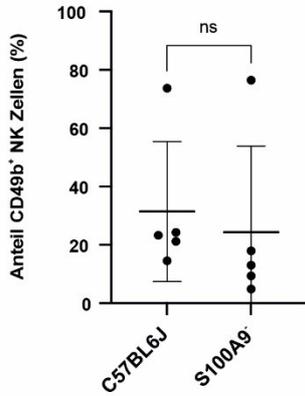
An Tag 21 konnte gezeigt werden, dass eine niedrigdosierte 5-AzaC Behandlung zu einem frühen Anstieg des Anteils reifer NK Zellen führt. Ein Fehlen von S100A8/A9 Proteinen konnte in dieser Hinsicht nicht als signifikant nachteilig identifiziert werden. Zwischen den drei Versuchsgruppen bestand zu diesem

Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ($p = .0003$, $M1 = 21.84 \pm 4.30\%$, $M2 = 54.92 \pm 15.48\%$, $M3 = 27.64 \pm 4.81\%$). Der Tukey *post-hoc* Test ergab, dass die mit 5-AzaC behandelte Tiere aus Gruppe 2 einen signifikant höheren Anteil von mNK Zellen aufwiesen als mit PBS behandelte Tiere der Gruppe 1 ($p = .0004$) und S100A8/A9 *Knockout* Tiere der Gruppe 3 ($p = .0021$). Zwischen Gruppe 1 und 3 wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt ($p = .623$).

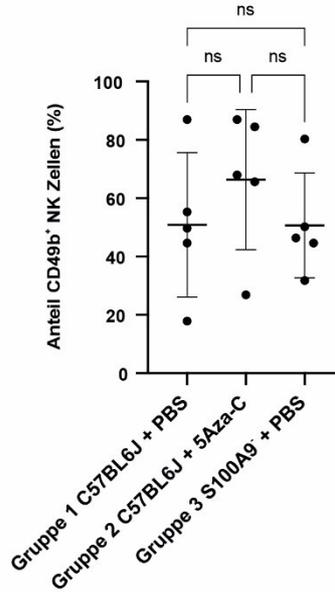
Auch an Tag 28 konnte ein signifikanter Unterschied in den Anteilen reifer NK Zellen im Verhältnis zu allen NK Zellen zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = .0374$, $M1 = 60.39 \pm 12.26\%$, $M2 = 39.79 \pm 6.62\%$, $M3 = 45.44 \pm 13.94\%$). Im Gegensatz zu den Beobachtungen an Tag 21 zeigten Tiere der Gruppe 2 an Tag 28 signifikant niedrigere Anteile reifer NK Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = .0354$). Ein Fehlen von S100A8/A9 Proteinen führte weder im Vergleich zur Gruppe 1 ($p = .136$) noch zur Gruppe 2 ($p = .719$) zu signifikanten Unterschieden in Bezug auf den Anteil an reifen NK Zellen (mNK).

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

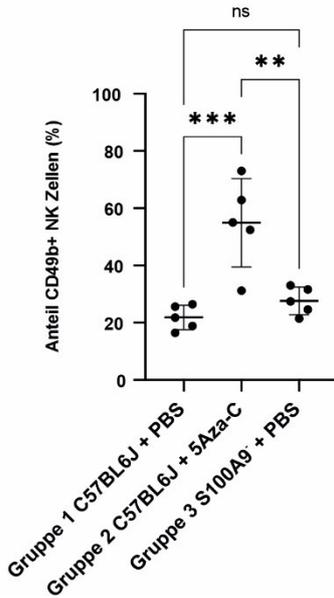
a) Tag 7 CD49b Expression
NK Zellen Milz



b) Tag 17 CD49b Expression
NK Zellen Milz



c) Tag 21 CD49b Expression
NK Zellen Milz



d) Tag 28 CD49b Expression
NK Zellen Milz

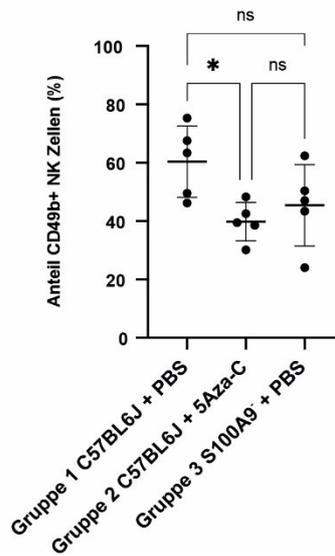


Abbildung 16: NK Zell Reifung im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)
b) - d): Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).
y-Achse: Prozentuale Darstellung des Anteils von NK Zellen, die CD49b exprimieren (lin⁻ CD122⁺ NK1.1⁺ CD49b⁺), gemessen mittels Durchflusszytometrie, relativ zu allen NK Zellen (lin⁻ CD122⁺ NK1.1⁺ CD49b^{+/-}).
a) Tag 7 CD49b Expression NK Zellen Milz: Mann-Whitney Test
b) Tag 17 CD49b Expression NK Zellen Milz: ANOVA
c) Tag 21 CD49b Expression NK Zellen Milz: ANOVA
d) Tag 28 CD49b Expression NK Zellen Milz: ANOVA

3.2.5 Phänotypische Reifung von murinen NK Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution

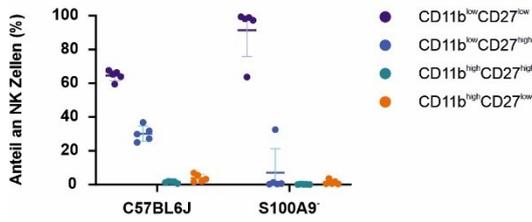
Zur Beurteilung der phänotypischen Ausreifung von NK Zellen wurde die in **Abbildung 3** gezeigte Einteilung von mNKs in vier aufeinanderfolgende, funktionelle Stadien mittels der beiden Oberflächenmarker CD11b und CD27 verwendet. Die von (Chiossone et al., 2009) beschriebene konsekutive Abfolge von $CD11b^{low}CD27^{low} \rightarrow CD11b^{low}CD27^{high} \rightarrow CD11b^{high}CD27^{high} \rightarrow CD11b^{high}CD27^{low}$ konnte nicht reproduziert werden.

Es ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein relevanter Anteil der beiden letzten Reifestufen von mNK, $CD11b^{high}CD27^{high}$ und $CD11b^{high}CD27^{low}$, nachweisen. Die Verteilung von mNK beschränkte sich folglich fast ausschließlich auf die ersten beiden Reifestufen, $CD11b^{low}CD27^{low}$ und $CD11b^{low}CD27^{high}$. Bei Betrachtung der Verteilung auf die vier konsekutiven Entwicklungsstufen entlang der Analysezeitpunkte konnte keine Entwicklung in Richtung Ausreifung festgestellt werden. Vielmehr betrug der Anteil der anfänglichen Reifestufe von mNK, $CD11b^{low}CD27^{low}$, an Tag 28 in der Milz in allen drei untersuchten Gruppen über 80%. Oben genanntes traf auf Milz und KM zu.

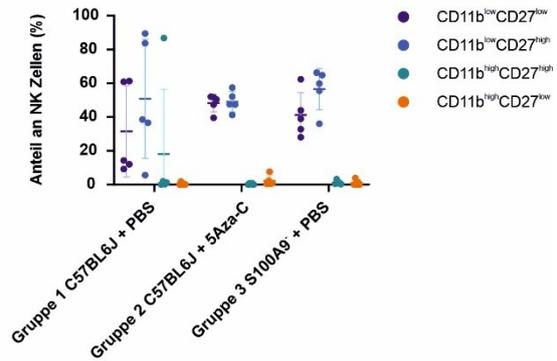
Bei fehlendem Nachweis einer Entwicklung entlang der oben genannten funktionellen Stadien wurde auf eine statistische Auswertung in Form von Hypothesentests verzichtet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen werden aus Platzgründen nicht genannt und können den untenstehenden Graphiken entnommen werden.

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

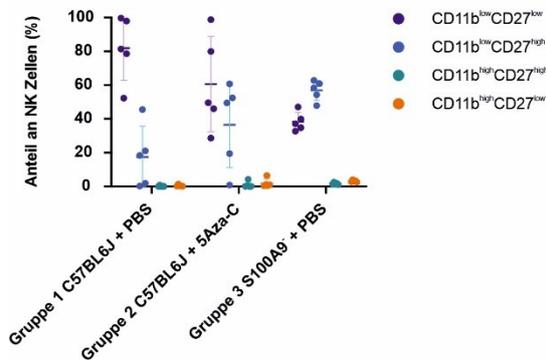
a) Tag 7 CD11b/CD27 NK Zellen KM



b) Tag 17 CD11b/CD27 NK Zellen KM



c) Tag 21 CD11b/CD27 NK Zellen KM



d) Tag 28 CD11b/CD27 NK Zellen KM

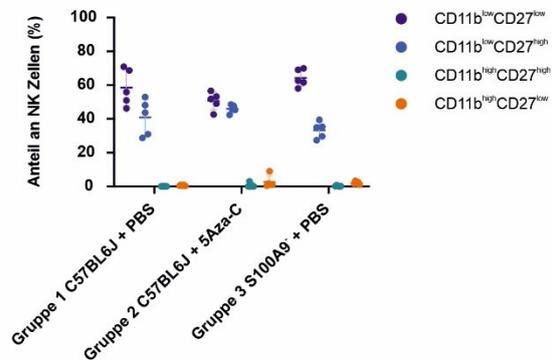


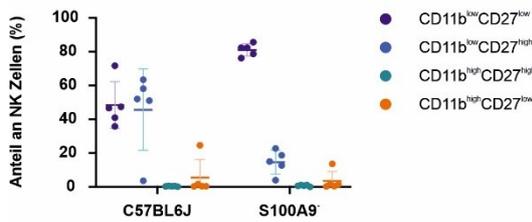
Abbildung 17: Subgruppen Entwicklung von mNK im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)

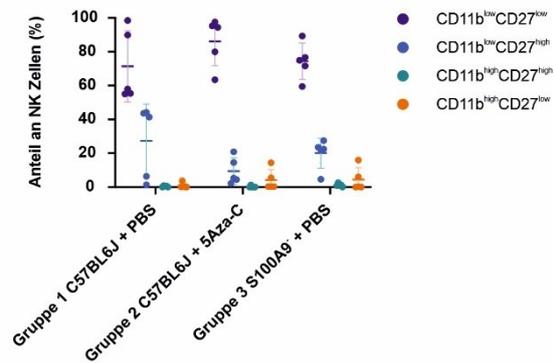
b) - d): Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Prozentuale Darstellung des Anteils der jeweiligen Subgruppe von reifen NK Zellen relativ zu allen reifen NK Zellen (lin⁻ CD122⁺ NK1.1⁺). Es werden die vier Entwicklungsstufen von mNK nach (Chirossone et al., 2009) gezeigt: CD11b^{low}CD27^{low} (lila) → CD11b^{low}CD27^{high} (blau) → CD11b^{high}CD27^{high} (türkis) → CD11b^{high}CD27^{low}.

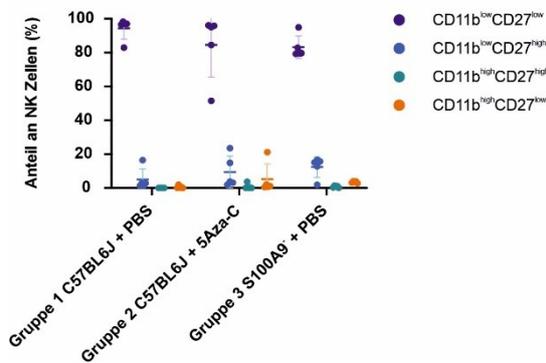
a) Tag 7 CD11b/CD27 NK Zellen Milz



b) Tag 17 CD11b/CD27 NK Zellen Milz



c) Tag 21 CD11b/CD27 NK Zellen Milz



d) Tag 28 CD11b/CD27 NK Zellen Milz

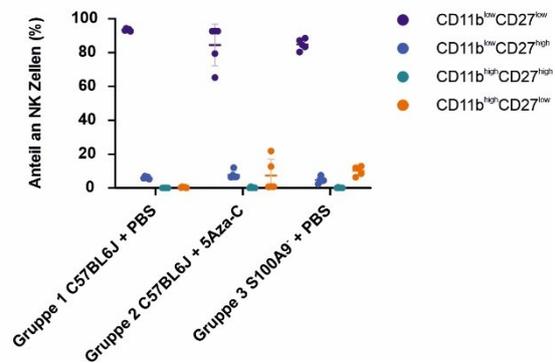


Abbildung 18: Subgruppen Entwicklung im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9⁻ (rechts)
b) - d): Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9⁻ + PBS“ (rechts).
y-Achse: Prozentuale Darstellung des Anteils der jeweiligen Subgruppe von reifen NK Zellen relativ zu allen reifen NK Zellen (lin⁻ CD122⁺ NK1.1⁺). Es werden die vier Entwicklungsstufen von mNK nach (Chiossone et al., 2009) gezeigt: CD11b^{low}CD27^{low} (lila) → CD11b^{low}CD27^{high} (blau) → CD11b^{high}CD27^{high} (türkis) → CD11b^{high}CD27^{low}.

3.2.6 F4/80⁺ Monozyten/Makrophagen Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

Reife Monozyten und Makrophagen wurden über den Marker F4/80 als lin⁻F4/80⁺ definiert (McKnight et al., 1996). Die durch die AG André in *in vitro* Vorarbeiten beschriebene Zunahme des Anteils von Monozyten im Kultursystem durch niedrigdosierte 5-AzaC Beigabe konnte nicht bestätigt werden. Es zeigten sich teilweise signifikant höheren Monozyten/Makrophagen Frequenzen in der Gruppe der S100A8/A9 *Knockout* Tiere im Vergleich zur Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere.

Die in der Literatur beschriebene Verschiebung der Hämatopoese in Richtung der myeloischen Reihe durch eine 5-AzaC-vermittelte irreversible DNMT1 Hemmung konnte folglich nicht nachgewiesen werden (Bröske et al., 2009, Hodges et al., 2011).

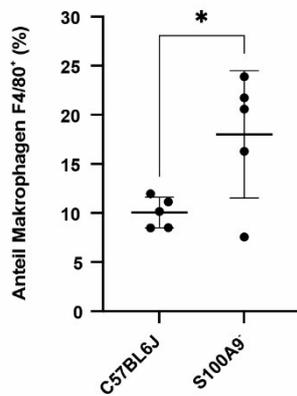
Zu allen Untersuchungszeitpunkten wies die Gruppe der S100A8/A9 defizienten Tiere die höchsten Makrophagen Frequenzen auf. An Tag 7 zeigten die Tiere der Linie S100A9^{-/-} eine signifikant höhere Makrophagen Frequenz im Vergleich zu den Tieren der Linie C57BL/6J ($p = .0282$, M1 = $10.05 \pm 1.56\%$, M2 = $18.01 \pm 6.47\%$).

An den Tagen 17 ($p = .0956$, M1 = $10.15 \pm 1.79\%$, M2 = $13.95 \pm 3.90\%$, M3 = $16.03 \pm 5.92\%$) und 21 ($p = .224$, M1 = $17.83 \pm 6.51\%$, M2 = $15.31 \pm 3.38\%$, M3 = $20.56 \pm 2.67\%$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

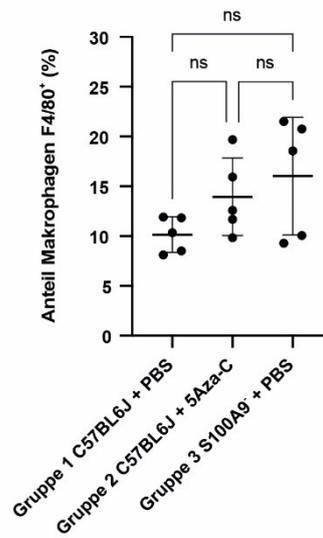
An Tag 28 konnte ein signifikanter Unterschied in der Makrophagen Frequenz festgestellt werden ($p < 0.0001$, M1 = $17.74 \pm 1.29\%$, M2 = $12.20 \pm 3.84\%$, M3 = $21.73 \pm 2.16\%$). Tiere, die mit 5-AzaC behandelt wurden, wiesen signifikant niedrigere Makrophagen Frequenzen auf als S100A8/A9 *Knockout* Mäuse, die mit PBS behandelt wurden ($p = .0012$). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den *Knockout* Mäusen ($p = .231$) bzw. zwischen der Kontrollgruppe und den mit 5-AzaC behandelten Tieren ($p = .231$) festgestellt werden.

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

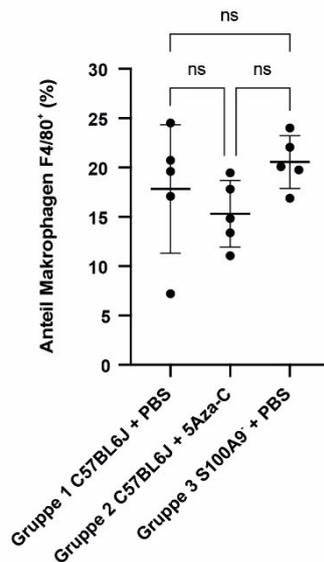
a) Tag 7 Makrophagen KM



b) Tag 17 Makrophagen KM



c) Tag 21 Makrophagen KM



d) Tag 28 Makrophagen KM

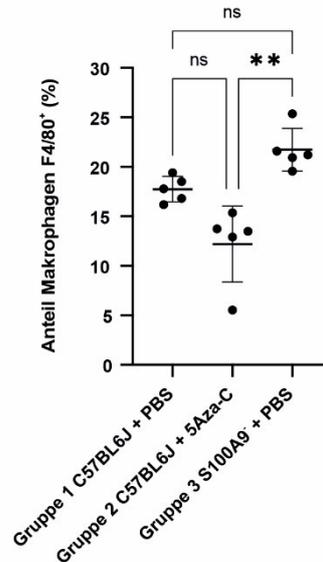


Abbildung 19: Monozyten/Makrophagen Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)

b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Monozyten/Makrophagen Frequenz (definiert als lin⁻F4/80⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle lin⁻ Zellen.

a) Tag 7 Makrophagen KM: ungepaarter t-Test

b) Tag 17 Makrophagen KM: Welch ANOVA

c) Tag 21 Makrophagen KM: ANOVA

d) Tag 28 Makrophagen KM: Kruskal-Wallis Test

3.2.7 Makrophagen Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Knochenmark zeigte die Gruppe der C57BL/6J Mäuse an Tag 7 in der Milz einen signifikant höheren prozentualen Anteil an Makrophagen im Vergleich zur Gruppe der *Knockout* Tiere ($p = .0490$, $M1 = 24.01 \pm 8.49\%$, $M2 = 14.09 \pm 4.41\%$).

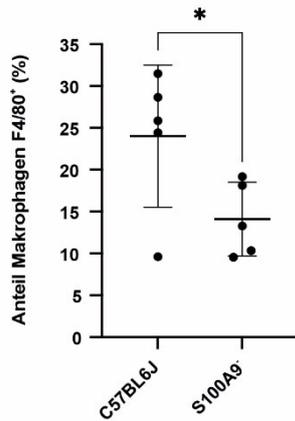
An den Tagen 17 ($p = .338$, $M1 = 4.66 \pm 0.51\%$, $M2 = 6.76 \pm 3.69\%$, $M3 = 5.18 \pm 1.10\%$) und 21 ($p = .383$, $M1 = 10.43 \pm 7.40\%$, $M2 = 5.95 \pm 3.10\%$, $M3 = 5.97 \pm 1.18\%$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden.

An Tag 28 wurde ein signifikanter Unterschied in der Makrophagen Frequenz festgestellt ($p = .0026$, $M1 = 5.16 \pm 0.93\%$, $M2 = 4.96 \pm 0.63\%$, $M3 = 7.59 \pm 1.38\%$). Dies entspricht den Ergebnissen der KM-Analyse an Tag 28, da auch in der Milz die Tiere der *Knockout* Gruppe signifikant höhere prozentuale Makrophagen Frequenzen aufwiesen im Vergleich zu den mit 5-AzaC behandelten Tiere der Gruppe 2 ($p = .0041$). Darüber hinaus wurden in der *Knockout* Gruppe, prozentual gesehen, auch signifikant mehr Makrophagen gefunden als in der Kontrollgruppe ($p = .0072$).

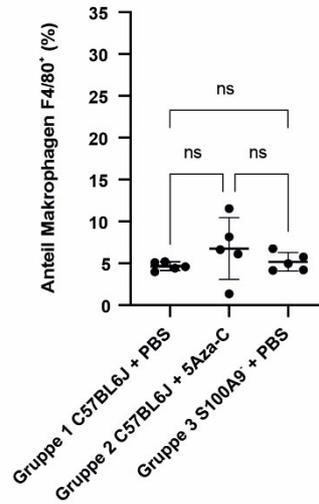
Zwischen Kontrollgruppe und 5-AzaC Gruppe konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = .948$).

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

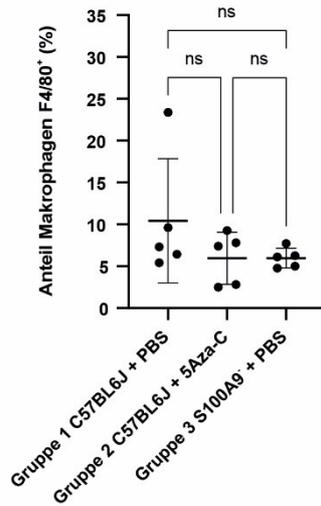
a) Tag 7 Makrophagen Milz



b) Tag 17 Makrophagen Milz



c) Tag 21 Makrophagen Milz



d) Tag 28 Makrophagen Milz

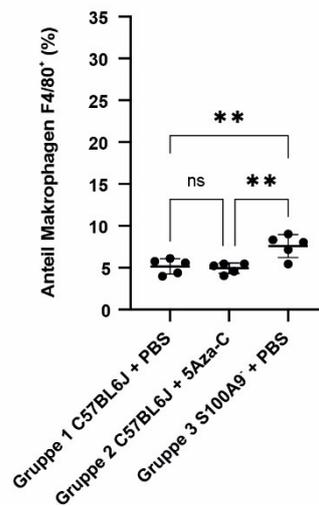


Abbildung 20: Monozyten/Makrophagen Regeneration im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)

b) – d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C“ (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Monozyten/Makrophagen Frequenz (definiert als lin⁺F4/80⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle lin⁺ Zellen.

a) Tag 7 Makrophagen Milz: ungepaarter t-Test

b) Tag 17 Makrophagen Milz: ANOVA

c) Tag 21 Makrophagen Milz: Kruskal-Wallis Test

d) Tag 28 Makrophagen Milz: ANOVA

3.2.8 Lineage⁻ Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

Zur Beurteilung der Zusammensetzung der Leukozyten Population nach subletaler Bestrahlung wurde der Anteil an *lineage* negativen Zellen unter allen Zellen bestimmt. Dabei wurden alle vitalen Zellen erfasst, die als CD3⁻CD19⁻Ly6G⁻, kurz lin⁻, definiert wurden und somit weder der Gruppe der neutrophilen Granulozyten noch der Gruppe der T- und B-Lymphozyten zuzuordnen waren.

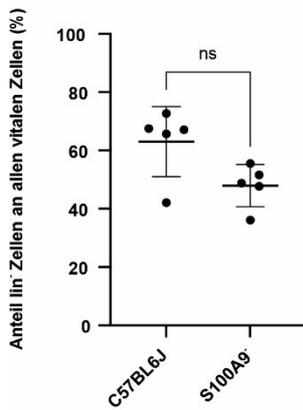
An Tag 7 nach subletaler Bestrahlung zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der lin⁻ Zellen zwischen der Gruppe der C57BL/6J Tiere und der Gruppe der S100A8/A9 *Knockout* Tiere ($p = .0952$, $M1 = 63,05 \pm 11,98\%$, $M2 = 47,96 \pm 7,27\%$).

An Tag 17 wies die *Knockout* Gruppe ($M3 = 64.16 \pm 3.71\%$) signifikant weniger lin⁻ Zellen auf im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = .0007$, $M1 = 79.96 \pm 3.29\%$) und zur Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere ($p = <.0001$, $M2 = 82.00 \pm 4.77\%$). Zwischen den letzten beiden Gruppen konnte zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = .154$).

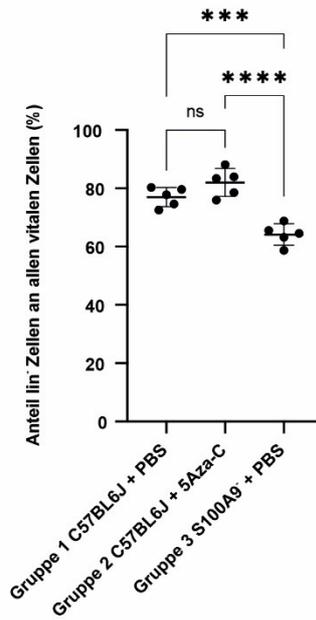
Signifikante Unterschiede im Anteil lin⁻ Zellen zwischen den drei Versuchsgruppen konnten auch an Tag 21 ($p = .704$, $M1 = 61.58 \pm 17.98\%$, $M2 = 56.95 \pm 5.51\%$, $M3 = 62.65 \pm 5.20\%$) und 28 ($p = .0680$, $M1 = 66.60 \pm 8.17\%$, $M2 = 71.70 \pm 7.69\%$, $M3 = 59.90 \pm 5.39\%$) nicht nachgewiesen werden.

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

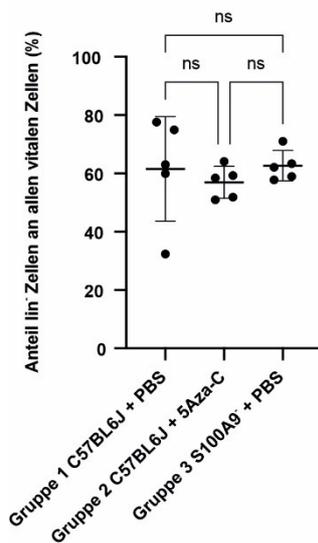
a) Tag 7 lineage⁻ Zellen KM



b) Tag 17 lineage⁻ Zellen KM



c) Tag 21 lineage⁻ Zellen KM



d) Tag 28 lineage⁻ Zellen KM

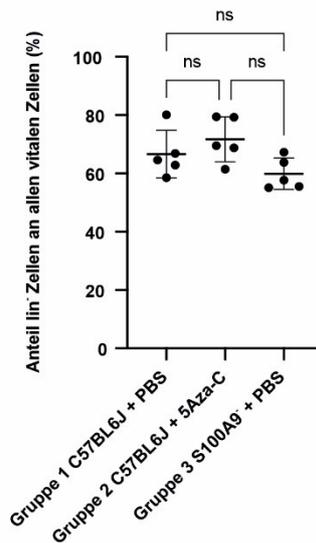


Abbildung 21: Lineage⁻ Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9⁻ (rechts)
b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (mittig) und „Gruppe 3 S100A9⁻ + PBS“ (rechts).
y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz von lin⁻ Zellen (definiert als CD3⁺CD19⁻Ly6G⁻). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle erfassten vitalen Zellen.
a) Tag 7 lineage⁻ Zellen KM: Mann-Whitney Test
b) Tag 17 lineage⁻ Zellen KM: ANOVA
c) Tag 21 lineage⁻ Zellen KM: ANOVA
d) Tag 28 lineage⁻ Zellen KM: ANOVA

3.2.9 Lineage- Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

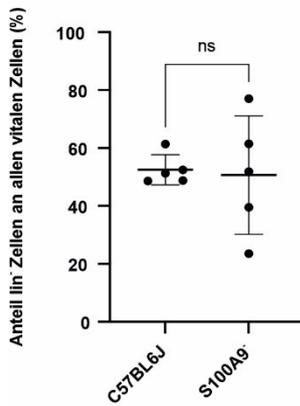
Bei Analyse des Milzgewebes wurden zu keinem der untersuchten Zeitpunkte signifikante Unterschiede im Anteil an *lineage* negativen Zellen zwischen den Gruppen festgestellt. Die entsprechenden Mittelwerte (M) mit den zugehörigen Standardabweichungen (SD) sowie die p-Werte können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 15: Lineage- Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

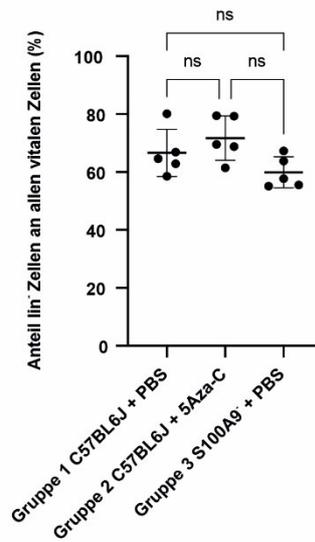
	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
Tag 7	p = .851	52.51 ± 5.23%	50.68 ± 20.45%	
Tag 17	p = .963	58.70 ± 3.26%	60.62 ± 15.11%	59.34 ± 11.58%
Tag 21	p = .182	47.86 ± 12.23%	58.47 ± 9.19%	56.90 ± 3.97%
Tag 28	p = .601	62.71 ± 9.63%	70.10 ± 10.35%	62.53 ± 6.40%
M = Mittelwert; SD = Standardabweichung				

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte (n = 5) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

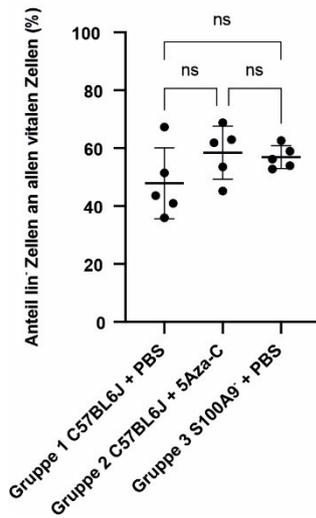
a) Tag 7 lineage⁻ Zellen Milz



b) Tag 17 lineage⁻ Zellen Milz



c) Tag 21 lineage⁻ Zellen Milz



d) Tag 28 lineage⁻ Zellen Milz

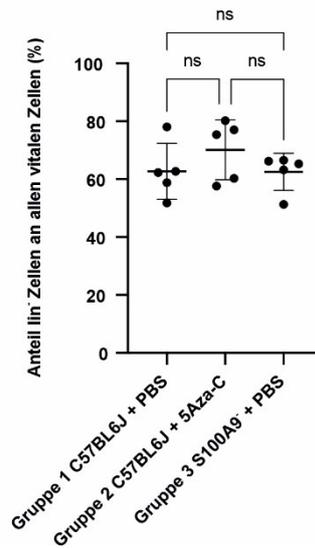


Abbildung 22: Lineage⁻ Zellen im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9⁻ (rechts)

b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (mittig) und „Gruppe 3 S100A9⁻ + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz von lineage⁻ Zellen (definiert als CD3⁺CD19⁻Ly6G⁻). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle erfassten vitalen Zellen.

a) Tag 7 lineage⁻ Zellen Milz: ungepaarter t-Test

b) Tag 17 lineage⁻ Zellen Milz: ANOVA

c) Tag 21 lineage⁻ Zellen Milz: ANOVA

d) Tag 28 lineage⁻ Zellen Milz: Kruskal-Wallis Test

3.2.10 Common Lymphoid Progenitors (CLPs) Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution

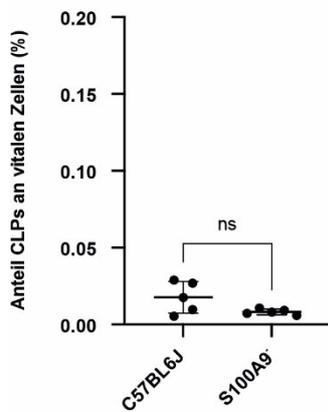
Zur Untersuchung der Regeneration lymphoider Progenitoren wurde die Frequenz von CLPs durchflusszytometrisch erfasst. CLPs wurden dabei als lin⁻CD127⁺Sca-1⁺CD117⁺ definiert. Aufgrund erheblicher interindividueller Unterschiede hinsichtlich des Anteils von CLPs an allen Zellen, was zu hohen Standardabweichungen führte, konnte lediglich an Tag 17 im KM ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = .0259$). Mit 5-AzaC behandelte Tiere der Gruppe 2 zeigten zu diesem Zeitpunkt signifikant höhere CLP-Frequenzen als *Knockout* Tiere der Gruppe 3 ($p = .0327$).

Aufgrund insgesamt sehr niedriger Zellfrequenzen ist die Aussagekraft der gemessenen Werte nur begrenzt. Dennoch werden sie hier der Vollständigkeit halber genannt und graphisch dargestellt. Die entsprechenden Mittelwerte mit den zugehörigen Standardabweichungen sowie die p -Werte können der folgenden Tabelle entnommen werden.

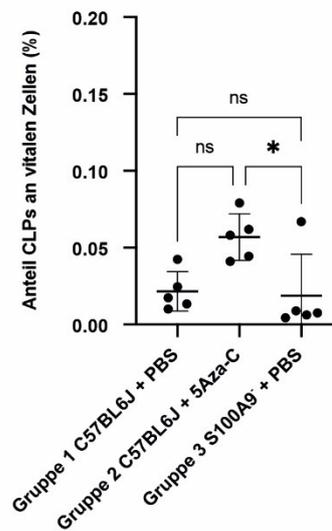
Tabelle 16: Common Lymphoid Progenitors (CLPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution

	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
Knochenmark				
Tag 7	$p = .109$	$0.018 \pm 0.010\%$	$0.0082 \pm 0.0018\%$	
Tag 17	$p = .026$	$0.022 \pm 0.013\%$	$0.057 \pm 0.015\%$	$0.019 \pm 0.027\%$
Tag 21	$p = .362$	$0.0081 \pm 0.013\%$	$0.012 \pm 0.017\%$	$0.029 \pm 0.048\%$
Tag 28	$p = .137$	$0.049 \pm 0.038\%$	$0.094 \pm 0.060\%$	$0.046 \pm 0.076\%$
Milz				
Tag 7	$p = .900$	$0.013 \pm 0.0082\%$	$0.012 \pm 0.0074\%$	
Tag 17	$p = .900$	$0.015 \pm 0.026\%$	$0.042 \pm 0.055\%$	$0.031 \pm 0.019\%$
Tag 21	$p = .177$	$0.0083 \pm 0.012\%$	$0.019 \pm 0.015\%$	$0.019 \pm 0.023\%$
Tag 28	$p = .053$	$0.038 \pm 0.020\%$	$0.075 \pm 0.023\%$	$0.031 \pm 0.057\%$
M = Mittelwert; SD = Standardabweichung				

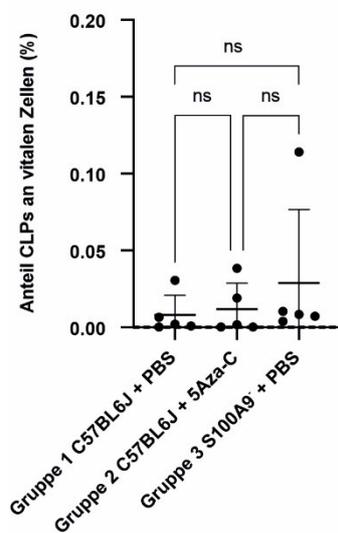
a) Tag 7 CLPs KM



b) Tag 17 CLPs KM



c) Tag 21 CLPs KM



d) Tag 28 CLPs KM

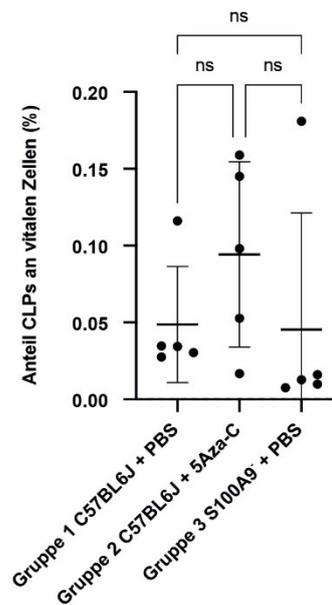


Abbildung 23: Common Lymphoid Progenitors (CLPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)

b) – d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C“ (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz von CLPs (definiert als lin⁺CD127⁺Sca-1⁺CD117⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle erfassten vitalen Zellen.

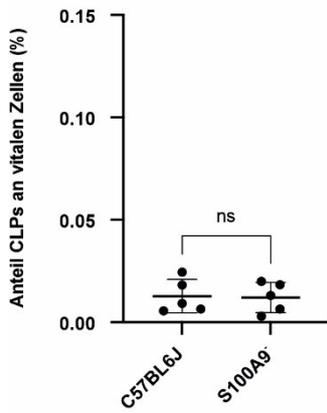
a) Tag 7 CLPs KM: Welch's t-Test

b) Tag 17 CLPs KM: Kruskal-Wallis Test

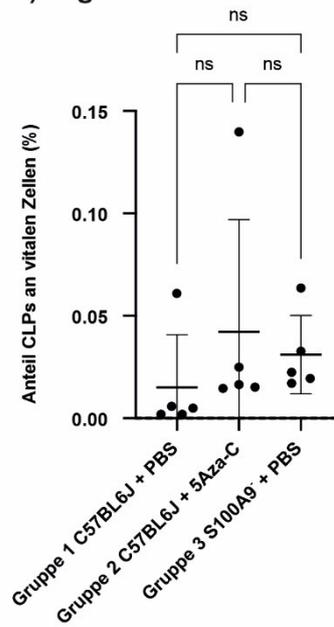
c) Tag 21 CLPs KM: Kruskal-Wallis Test

d) Tag 28 CLPs KM: Kruskal-Wallis Test

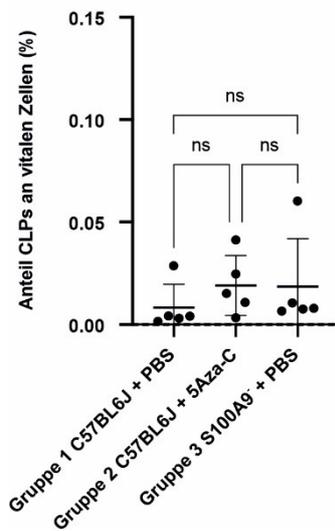
a) Tag 7 CLPs Milz



b) Tag 17 CLPs Milz



c) Tag 21 CLPs Milz



d) Tag 28 CLPs Milz

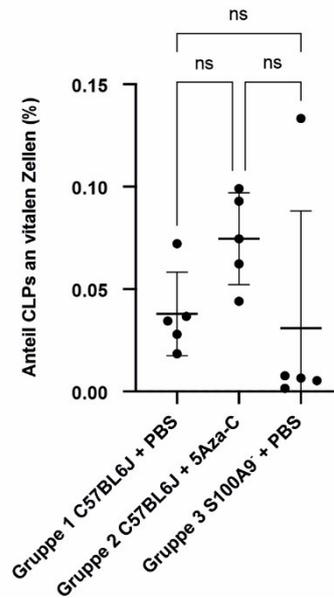


Abbildung 24: Common Lymphoid Progenitors (CLPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Milz

x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)

b) – d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz von CLPs (definiert als lin⁻CD127⁺Sca-1⁺CD117⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle erfassten vitalen Zellen.

a) Tag 7 CLPs Milz: ungepaarter t-Test

b) Tag 17 CLPs Milz: Kruskal-Wallis Test

c) Tag 21 CLPs Milz: Kruskal-Wallis Test

d) Tag 28 CLPs Milz: Kruskal-Wallis Test

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

3.2.11 Common Myeloid Progenitors (CMPs) Regeneration während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution

Zur Untersuchung der Regeneration myeloider Progenitoren wurde die Frequenz von CMPs durchflusszytometrisch erfasst. CMPs wurden dabei als $lin^{-}CD127^{-}Sca-1^{-}CD117^{+}CD34^{+}CD16/32^{-}$ definiert. Die unter Abschnitt 3.2.10 genannten Limitationen hinsichtlich der Aussagekraft der erhobenen Daten aufgrund niedriger Zellfrequenzen bei hohen interindividuellen Unterschieden treffen auch hier zu.

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurden an Tag 17 ($p = .0016$) und Tag 21 ($p = .0157$) bei der Analyse des Knochenmarks festgestellt. Zu beiden Zeitpunkten fanden sich in der Gruppe der S100A8/A9 defizienten Tiere signifikant höhere Anteile an CMPs als in der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere (Tag 17: $p = .0013$, Tag 21: $p = .0132$). An Tag 17 zeigten die *Knockout* Tiere zudem signifikant höhere CMP-Frequenzen als die Kontrollgruppe ($p = .0247$), an Tag 21 war dies nicht der Fall ($p = .113$). Zwischen den mit 5-AzaC behandelten Tieren und der Kontrollgruppe bestand weder an Tag 17 ($p = .255$) noch an Tag 21 ($p = .464$) ein signifikanter Unterschied.

Für alle Gruppen wurden zu den Analysezeitpunkten Tag 17 und Tag 21 im Knochenmark die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die in der untenstehenden Tabelle genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

a) Tag 17 CMPs KM

b) Tag 21 CMPs KM

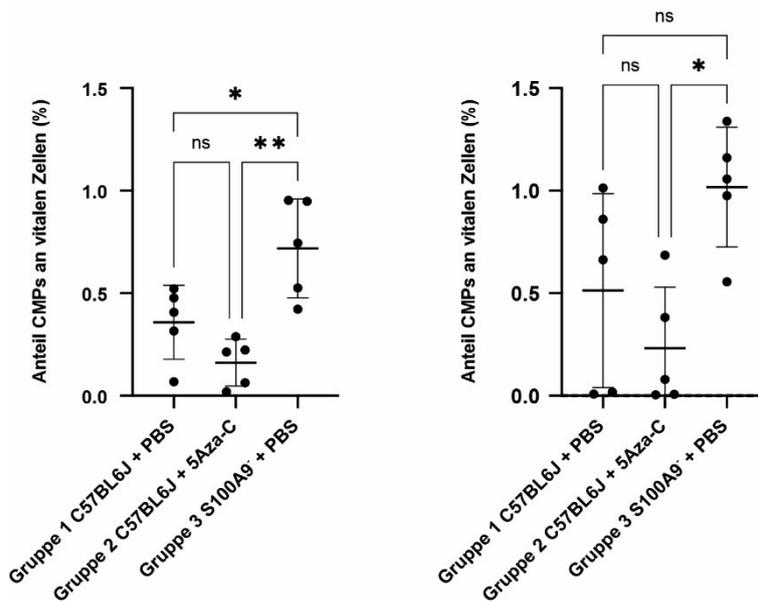


Abbildung 25: Common Myeloid Progenitors (CMPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark

x-Achse: Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C“ (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz von CMPs (definiert als lin⁻CD127⁻Sca-1⁻CD117⁺CD34⁺CD16/32⁻). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle erfassten vitalen Zellen.

a) Tag 17 CMPs KM: ANOVA

b) Tag 21 CMPs KM: ANOVA

Bei der Analyse des Milzgewebes bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen. Die Mittelwerte, begleitet von den entsprechenden Standardabweichungen, sowie die p-Werte für alle Untersuchungszeitpunkte können der folgenden Tabelle entnommen werden.

Tabelle 17: Common Myeloid Progenitors (CMPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution

	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
Knochenmark				
Tag 7	Aufgrund zu geringer Zellzahlen war keine statistische Auswertung möglich.			
Tag 17	p = .0016	0.36 ± 0.18%	0.16 ± 0.11%	0.72 ± 0.24%
Tag 21	p = .0157	0.51 ± 0.47%	0.23 ± 0.30%	1.02 ± 0.29%
Tag 28	p = .239	0.54 ± 0.15%	0.56 ± 0.13%	0.67 ± 0.06%

Milz				
Tag 7	p = .0474	0.28 ± 0.16%	0.079 ± 0.043%	
Tag 17	p = .963	0.013 ± 0.0069%	0.012 ± 0.011%	0.033 ± 0.0099%
Tag 21	p = .601	0.23 ± 0.48%	0.0034 ± 0.026%	0.032 ± 0.0059%
Tag 28	p = .437	0.025 ± 0.015%	0.032 ± 0.0099%	0.022 ± 0.010%
M = Mittelwert; SD = Standardabweichung				

3.2.12 Regeneration von *Megakaryocyte-erythroid Progenitors* (MEPs) und *Granulocyte-monocyte Progenitors* (GMPs) während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution

Zur Untersuchung der Regeneration von Megakaryozyten-Erythrozyten Progenitoren (MEPs) und Granulozyten-Monozyten Progenitoren (GMPs) wurde die Frequenz von MEPs und GMPs durchflusszytometrisch erfasst. MEPs wurden dabei als $lin^{-}CD127^{-}Sca-1^{-}CD117^{+}CD34^{-}CD16/32^{-}$ definiert. GMPs wurden als $lin^{-}CD127^{-}Sca-1^{-}CD117^{+}CD34^{+}CD16/32^{+}$ definiert.

Aufgrund der unter Abschnitt 3.2.10 genannten Limitationen hinsichtlich der Aussagekraft der erhobenen Daten aufgrund niedriger Zellfrequenzen bei hohen interindividuellen Unterschieden wird aus Platzgründen auf eine graphische Darstellung verzichtet.

Signifikante Unterschiede in der MEP-Frequenz fanden sich an Tag 7 im KM (p = .0027) und an Tag 17 bei der Analyse des Milzgewebes (p = .0380). An Tag 7 im KM wiesen die S100A8/A9 *Knockout* Mäuse signifikant mehr MEPs auf als die Tiere der Kontrollgruppe (p = .0027).

An Tag 17 zeigte die Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere einen signifikant höheren Anteil von MEPs in der Milz im Vergleich zur Kontrollgruppe (p = .040). Kein signifikanter Unterschied bestand jeweils zwischen den epigenetisch

modulierten Tieren und der *Knockout* Gruppe ($p = .774$) sowie zwischen der Kontrollgruppe und der *Knockout* Gruppe ($p = .537$).

Signifikante Unterschiede in der GMP-Frequenz fanden sich bei Analyse des Milzgewebes an Tag 7 ($p = .0079$) und Tag 28 ($p = .0458$). An Tag 7 konnte in der Kontrollgruppe ein signifikant höherer Anteil an GMPs im Vergleich zur *Knockout* Gruppe nachgewiesen werden ($p = .0079$). An Tag 28 zeigte die Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere signifikant höhere GMP-Frequenzen als die S100A8/A9 defizienten Tiere ($p = .0486$). Zwischen der 5-AzaC Gruppe und der Kontrollgruppe ($p = .472$) sowie zwischen der *Knockout*- und der Kontrollgruppe ($p = .967$) bestand kein signifikanter Unterschied in der GMP-Frequenz.

Die Mittelwerte, begleitet von den entsprechenden Standardabweichungen, sowie die p-Werte für alle Untersuchungszeitpunkte können den folgenden beiden Tabellen entnommen werden.

Tabelle 18: Megakaryocyte-erythroid Progenitors (MEPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution

	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
Knochenmark				
Tag 7	$p = .0027$	$1.25 \pm 0.18\%$	$5.90 \pm 2.43\%$	
Tag 17	$p = .857$	$1.90 \pm 0.65\%$	$1.94 \pm 0.35\%$	$2.07 \pm 0.51\%$
Tag 21	$p = .121$	$1.66 \pm 1.66\%$	$4.40 \pm 2.91\%$	$3.39 \pm 0.47\%$
Tag 28	$p = .459$	$1.65 \pm 0.58\%$	$2.11 \pm 1.17\%$	$1.47 \pm 0.31\%$
Milz				
Tag 7	$p = .225$	$1.98 \pm 0.59\%$	$1.43 \pm 0.72\%$	
Tag 17	$p = .0380$	$0.84 \pm 0.15\%$	$1.19 \pm 0.13\%$	$0.93 \pm 0.37\%$
Tag 21	$p = .725$	$0.90 \pm 0.36\%$	$0.88 \pm 0.25\%$	$0.92 \pm 0.15\%$
Tag 28	$p = .448$	$0.94 \pm 0.18\%$	$1.10 \pm 0.34\%$	$1.12 \pm 0.18\%$
M = Mittelwert; SD = Standardabweichung				

Tabelle 19: *Granulocyte-monocyte Progenitors* (GMPs) im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution

	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
Knochenmark				
Tag 7	Aufgrund zu geringer Zellzahlen war keine statistische Auswertung möglich.			
Tag 17	p = .0606	0.69 ± 0.15%	1.27 ± 0.56%	1.33 ± 0.11%
Tag 21	p = .444	0.73 ± 0.82%	0.56 ± 0.70%	1.12 ± 0.39%
Tag 28	p = .641	1.14 ± 0.17%	0.98 ± 0.27%	1.10 ± 0.37%
Milz				
Tag 7	p = .0079	0.97 ± 0.57%	0.0060 ± 0.013%	
Tag 17	p = .0995	0.014 ± 0.014%	0.028 ± 0.033%	0.033 ± 0.011%
Tag 21	p = .832	0.16 ± 0.31%	0.038 ± 0.033%	0.022 ± 0.013%
Tag 28	p = .0458	0.027 ± 0.014%	0.038 ± 0.012%	0.020 ± 0.0099%
M = Mittelwert; SD = Standardabweichung				

3.2.13 Regeneration hämatopoetischer Vorläuferzellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution: CD34 und CD117 Expression im Knochenmark

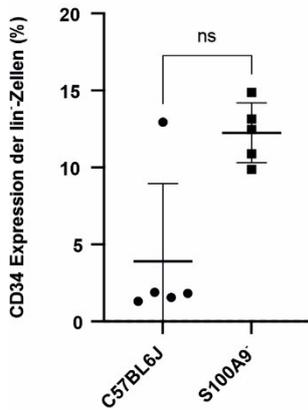
Zur Untersuchung des Anteils hämatopoetischer Stamm- und Progenitorzellen im Knochenmark nach subletaler Bestrahlung wurde die CD34 und die CD117 Expression durchflusszytometrisch bestimmt (Krause et al., 1994, Ogawa et al., 1991). Ein Fehlen von S100A8/A9 Proteinen scheint mit einem höheren Anteil hämatopoetischer Vorläuferzellen einherzugehen und könnte folglich für eine verzögerte Ausreifung hämatopoetischer Stamm- und Vorläuferzellen sprechen. Für eine niedrigdosierte Gabe von 5-AzaC konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe kein signifikanter Effekt auf die CD34 Expression nachgewiesen werden.

Zu allen Analysezeitpunkten zeigte sich in der Gruppe der S100A8/A9 *Knockout* Tiere der höchste Anteil CD34 exprimierender Zellen. Zu den Zeitpunkten Tag 7

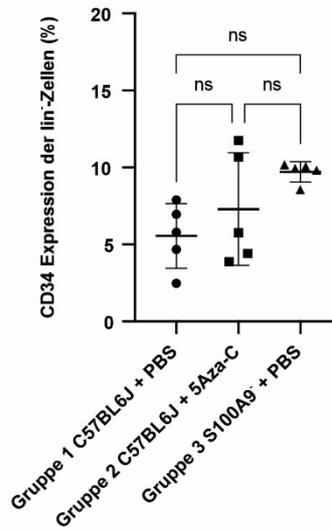
($p = .0556$, $M1 = 3.90 \pm 5.06\%$, $M2 = 12.25 \pm 1.94\%$), Tag 17 ($p = .123$, $M1 = 5.56 \pm 2.11\%$, $M2 = 7.30 \pm 3.66\%$, $M3 = 9.71 \pm 0.66\%$) und Tag 21 ($p = .0602$, $M1 = 9.56 \pm 7.38\%$, $M2 = 6.42 \pm 5.64\%$, $M3 = 14.46 \pm 2.33\%$) war dieser Unterschied nicht signifikant. An Tag 28 bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den untersuchten Gruppen ($p = .0092$, $M1 = 13.16 \pm 2.16$, $M2 = 9.89 \pm 1.91\%$, $M3 = 15.12 \pm 1.60\%$). In der Gruppe der *Knockout* Mäuse wurde ein signifikant höherer Anteil an CD34 exprimierenden Zellen gefunden im Vergleich zur Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere ($p = .0140$). Zu diesem Zeitpunkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der *Knockout*- und der Kontrollgruppe ($p = .688$) sowie zwischen der 5-AzaC- und der Kontrollgruppe ($p = .312$).

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

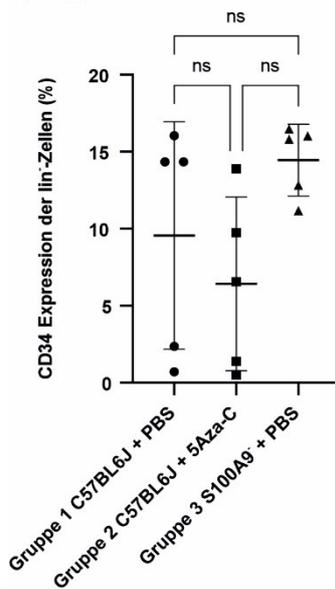
a) Tag 7 CD34 KM



b) Tag 17 CD34 KM



c) Tag 21 CD34 KM



d) Tag 28 CD34 KM

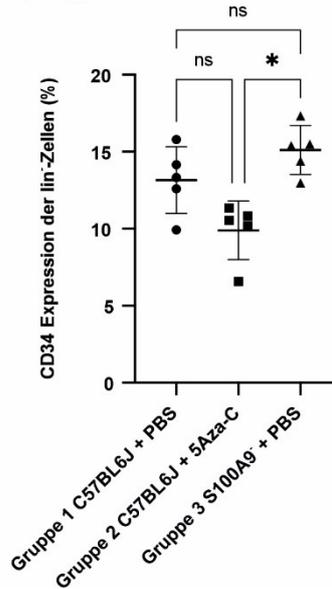


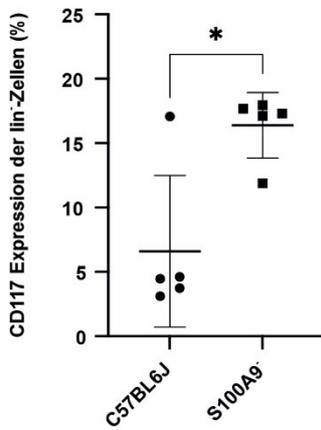
Abbildung 26: CD34 Expression im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)
b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C“ (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).
y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz CD34 exprimierender Zellen (definiert als lin⁻CD34⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle lin⁻ Zellen.
a) Tag 7 CD34 KM: Mann-Whitney Test
b) Tag 17 CD34 KM: Kruskal-Wallis Test
c) Tag 21 CD34 KM: Welch-ANOVA
d) Tag 28 CD34 KM: Kruskal-Wallis Test

An Tag 7 wiesen Tiere der *Knockout* Gruppe einen signifikant höheren Anteil CD117 exprimierender Zellen auf im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe ($p = .0159$, $M1 = 6.60 \pm 5.89\%$, $M2 = 16.39 \pm 2.54\%$). An Tag 17 war der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant ($p = .0025$, $M1 = 8.25 \pm 1.87\%$, $M2 = 9.13 \pm 2.71\%$, $M3 = 13.68 \pm 1.26\%$). In der Gruppe der S100A8/A9 defizienten Tiere wurden signifikant höhere Anteile an CD117 exprimierenden Zellen festgestellt im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p = .0031$) und zur Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tieren ($p = .0105$). Zwischen den beiden letztgenannten Gruppen bestand zu diesem Zeitpunkt kein signifikanter Unterschied ($p = .776$).

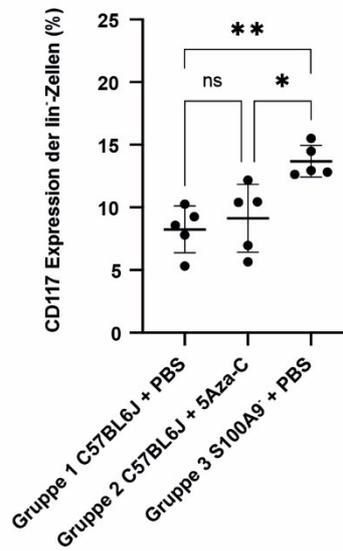
Auch an Tag 21 ($p = .0294$, $M1 = 8.49 \pm 7.96\%$, $M2 = 18.51 \pm 4.40\%$, $M3 = 15.65 \pm 0.79\%$) und Tag 28 ($p = .0055$, $M1 = 12.11 \pm 1.94\%$, $M2 = 9.96 \pm 2.64\%$, $M3 = 16.17 \pm 2.70\%$) wurden signifikante Unterschiede im Anteil CD117 exprimierender Zellen zwischen den drei Versuchsgruppen festgestellt. An Tag 21 zeigten mit 5-AzaC behandelte Tiere einen signifikant höheren Anteil CD117 exprimierender Zellen als die Tiere der Kontrollgruppe ($p = .0273$). Kein Unterschied bestand jeweils zwischen der *Knockout* Gruppe und der Kontrollgruppe ($p = .121$) bzw. der 5-AzaC Gruppe ($p = .676$). An Tag 28 zeigte die Gruppe der S100A8/A9 defizienten Tiere erneut signifikant höhere Anteile an CD117 exprimierenden Zellen als die 5-AzaC Gruppe ($p = .0046$). Kein Unterschied bestand zu diesem Untersuchungszeitpunkt zwischen der Kontrollgruppe und der 5-AzaC Gruppe ($p = .378$) sowie zwischen der Kontrollgruppe und der *Knockout* Gruppe ($p = .0548$).

Für alle Gruppen wurden zu allen Analysezeitpunkten die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

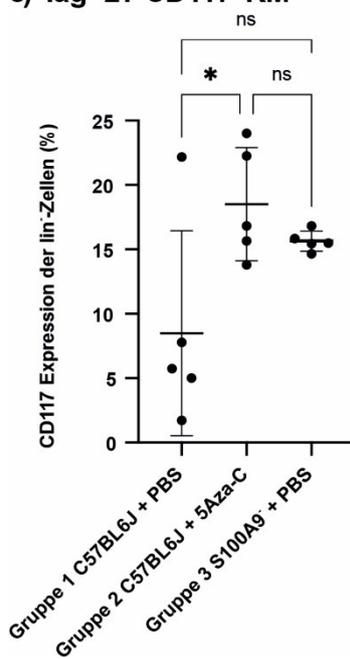
a) Tag 7 CD117 KM



b) Tag 17 CD117 KM



c) Tag 21 CD117 KM



d) Tag 28 CD117 KM

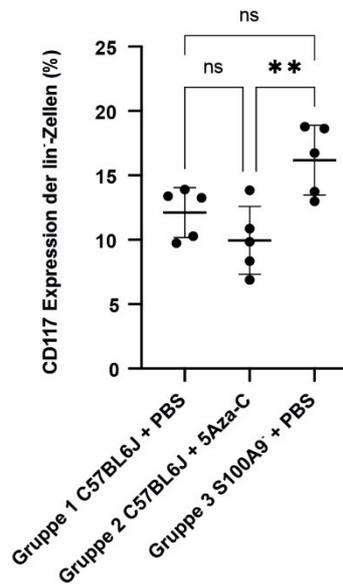


Abbildung 27: CD117 Expression im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution: Knochenmark
x-Achse: a): Darstellung der beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9^{-/-} (rechts)
b) - d): Gezeigt werden jeweils die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C“ (mittig) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).
y-Achse: Darstellung der mittels Durchflusszytometrie bestimmten Frequenz CD34 exprimierender Zellen (definiert als lin⁻CD34⁺). Die Darstellung erfolgt prozentual in Bezug auf alle lin⁻ Zellen.
a) Tag 7 CD34 KM: Mann-Whitney Test
b) Tag 17 CD34 KM: ANOVA
c) Tag 21 CD34 KM: ANOVA
d) Tag 28 CD34 KM: ANOVA

3.3 Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung von NK Zellen während der frühen hämatopoetischen Rekonstitution

Um die NK Zellaktivität und -funktionalität nach subletaler Bestrahlung zu bewerten, wurde ihre Fähigkeit zur Lyse von MHC-I defiziente Zellen der Linie RMA-S quantifiziert.

3.3.1 Spezifischer *kill* Milz

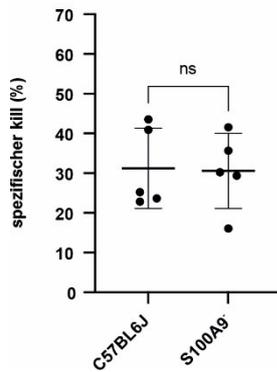
Tag 7

Aufgrund eines Messfehlers konnte für das Effektor – *Target* Verhältnis von 50:1 keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

Für die Effektor – *Target* Verhältnisse von 100:1 ($p = .920$, $M1 = 31.23 \pm 10.11\%$, $M2 = 30.58 \pm 9.48\%$) und 500:1 ($p = .804$, $M1 = 49.58 \pm 12.15\%$, $M2 = 51.65 \pm 13.40\%$) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Lyserate zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Ein Fehlen von S100A8A/A9 Proteinen wirkt sich folglich nicht nachteilig auf die sehr frühe NK Zell Funktionalität nach subletaler Bestrahlung aus.

Für die drei Versuchsgruppen Gruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

a) Tag 7 spezifischer kill Milz
100:1 (E:T)



b) Tag 7 spezifischer kill Milz
500:1 (E:T)

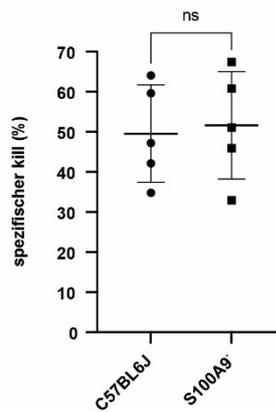


Abbildung 28: Spezifischer kill Milz Tag 7

x-Achse: Gezeigt werden die beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9⁻ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 7 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ungepaarter t-Test

b) Tag 7 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ungepaarter t-Test

Tag 17

Bei allen drei untersuchten E:T Verhältnissen zeigten die mit 5-AzaC epigenetisch modulierten Mäuse die höchsten Lyseraten. Für die E:T Verhältnisse 50:1 ($p = .177$, $M1 = 16.83 \pm 12.83\%$, $M2 = 23.62 \pm 11.04\%$, $M3 = 12.31 \pm 3.73\%$) und 100:1 ($p = .0618$, $M1 = 18.17 \pm 14.51\%$, $M2 = 33.05 \pm 10.59\%$, $M3 = 18.36 \pm 3.01\%$) war der Unterschied zwischen den Gruppen nicht signifikant.

Bei einem E:T Verhältnis von 500:1 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden ($p = .0212$, $M1 = 39.40 \pm 9.71\%$, $M2 = 53.39 \pm 8.74\%$, $M3 = 42.34 \pm 7.58\%$). Tiere, die mit 5-AzaC behandelt wurden, zeigten signifikant höhere spezifische Lyseraten als Tiere der Kontrollgruppe ($p = .0244$). Zu diesem Zeitpunkt bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der *Knockout* Tiere und der Kontrollgruppe ($p = .848$), ebenso wenig zwischen der Gruppe der *Knockout* Tiere und der 5-AzaC Gruppe ($p = .101$). Eine niedrigdosierte 5-AzaC Behandlung wirkt sich positiv auf den frühen Funktionalitätserwerb von NK Zellen nach subletaler Bestrahlung aus.

Für die drei Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte (n = 5) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

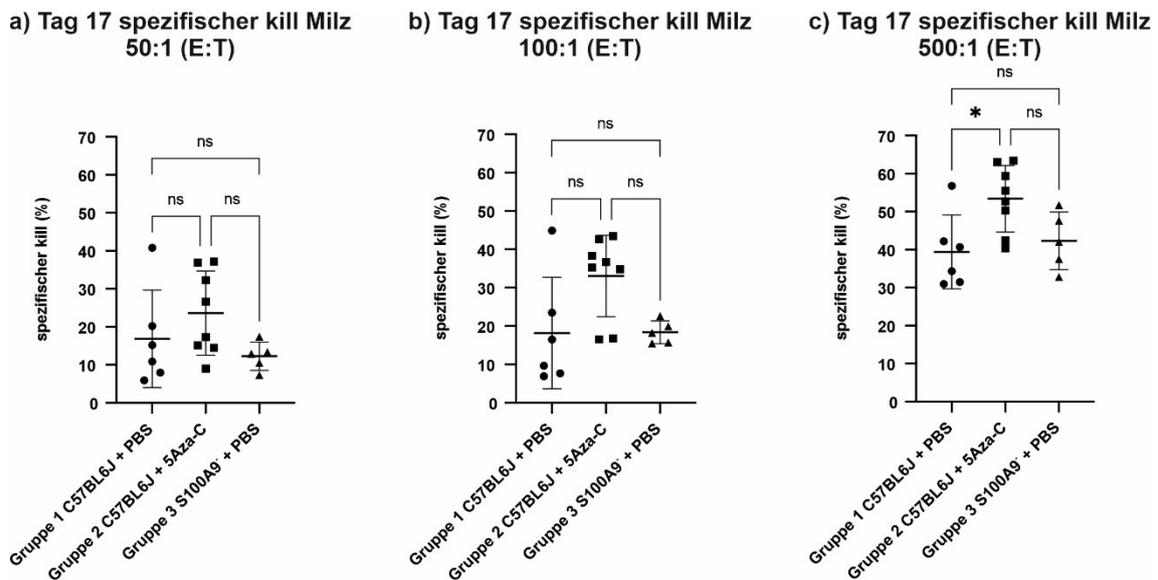


Abbildung 29: Spezifischer kill Milz Tag 17

x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 17 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ANOVA

b) Tag 17 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): Kruskal-Wallis Test

c) Tag 17 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

Tag 21

Auch an Tag 21 konnte für die E:T Verhältnisse von 50:1 ($p = .482$, $M1 = 21.62 \pm 5.25\%$, $M2 = 25.11 \pm 6.30\%$, $M3 = 25.42 \pm 5.60\%$) und 100:1 ($p = .0575$, $M1 = 26.97 \pm 4.97\%$, $M2 = 30.08 \pm 5.99\%$, $M3 = 35.61 \pm 5.14\%$) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Bei Verwendung eines E:T Verhältnisses von 500:1 konnte ein signifikanter Unterschied in den spezifischen *kill* Werten zwischen den Gruppen festgestellt werden ($p = .0140$, $M1 = 38.32 \pm 4.73\%$, $M2 = 42.08 \pm 5.02\%$, $M3 = 49.81 \pm 6.75\%$). Tiere der *Knockoutgruppe* zeigten signifikant höhere Lyseraten als Tiere

der Kontrollgruppe ($p = .0114$). Zwischen Kontrollgruppe und der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere ($p = .516$) sowie zwischen letzterer und der *Knockout* Gruppe ($p = .106$) fand sich kein signifikanter Unterschied.

Für die drei Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

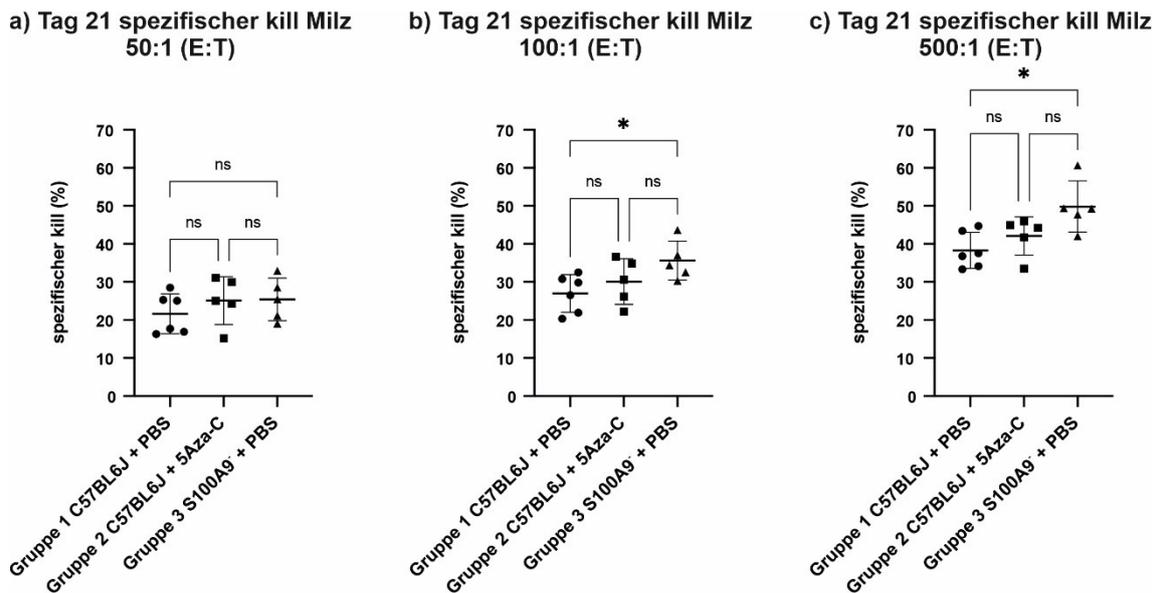


Abbildung 30: spezifischer kill Milz Tag 21

x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 21 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ANOVA

b) Tag 21 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

c) Tag 21 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

Tag 28

An Tag 28 zeigte sich für die E:T Verhältnisse 50:1 ($p = .0598$, $M1 = 38.99 \pm 1.41\%$, $M2 = 34.82 \pm 9.09\%$, $M3 = 29.29 \pm 3.77\%$), 100:1 ($p = .608$, $M1 = 46.18 \pm 2.14\%$, $M2 = 43.56 \pm 8.18\%$, $M3 = 42.64 \pm 5.15\%$) und 500:1 ($p = .216$, $M1 = 50.30 \pm 4.20\%$, $M2 = 48.04 \pm 8.37\%$, $M3 = 55.15 \pm 5.09\%$) kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Bei der *Post-Hoc* Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass Tiere der Kontrollgruppe an Tag 28 für das E:T Verhältnis von 50:1 eine signifikant höhere Lyserate aufwiesen als Tiere der *Knockout* Gruppe ($p = .0496$).

Für die drei Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte (n = 5) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

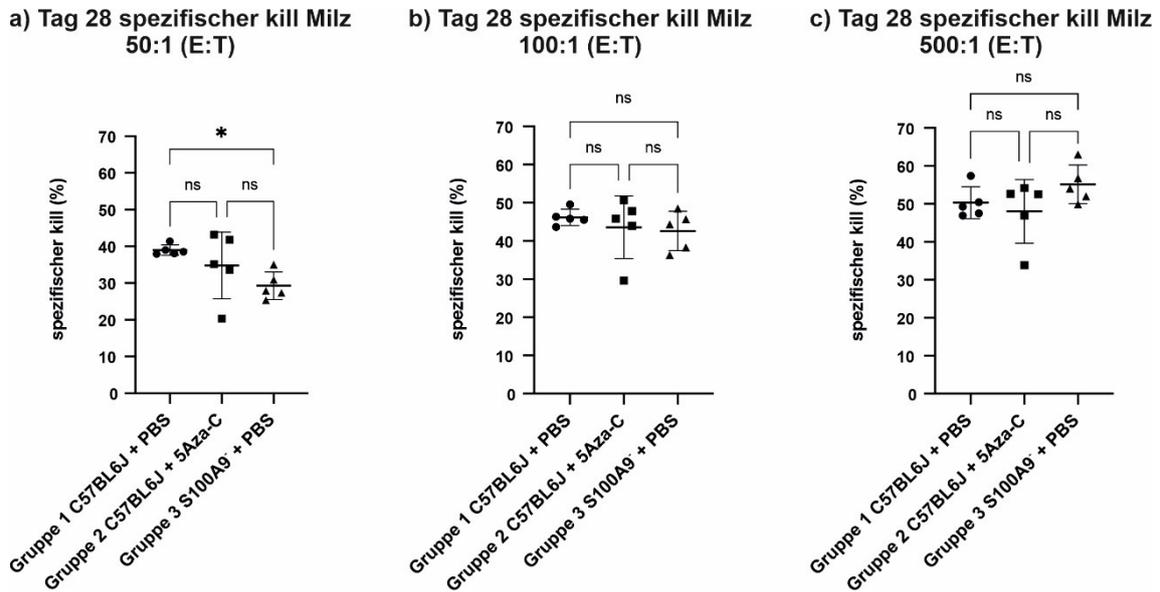


Abbildung 31: Spezifischer kill Milz Tag 28

x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 17 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ANOVA

b) Tag 17 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

c) Tag 17 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

3.3.2 Spezifischer *kill* Knochenmark

Tag 7

Aufgrund eines Messfehlers konnte für das Effektor – *Target* Verhältnis von 50:1 keine statistische Auswertung durchgeführt werden.

Für das E:T Verhältnis von 100:1 konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen festgestellt werden ($p = .632$, $M1 = 19.14 \pm 7.56\%$, $M2 = 21.55 \pm 7.77\%$).

Bei Verwendung eines E:T Verhältnisses von 500:1 zeigte die Gruppe der S100A8/A9 *Knockout* Mäuse signifikant höhere Lyseraten als die C57BL/6J Tiere der Kontrollgruppe ($p = .0086$, $M1 = 15.85 \pm 4.36\%$, $M2 = 24.76 \pm 3.77\%$).

Für die beiden Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

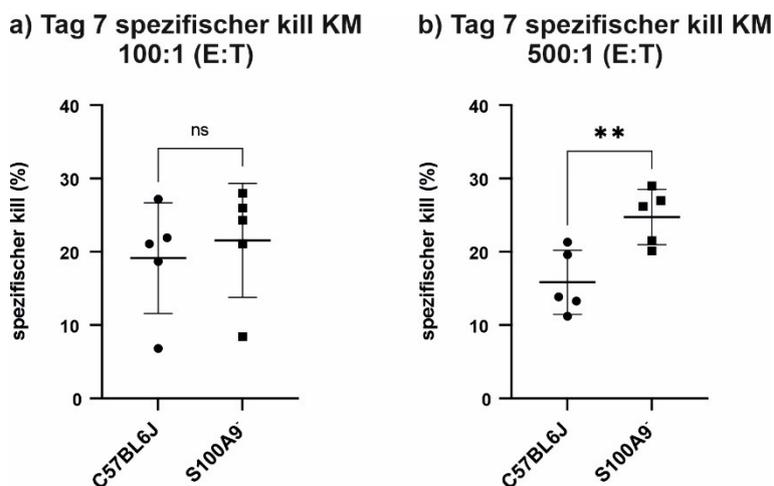


Abbildung 32: Spezifischer kill Knochenmark Tag 7

x-Achse: Gezeigt werden die beiden Mauslinien C57BL/6J (links) und S100A9- (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 7 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ungepaarter t-Test

b) Tag 7 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ungepaarter t-Test

Tag 17

An Tag 17 konnte für alle drei untersuchten E:T Verhältnisse, nämlich 50:1 ($p = .302$, $M1 = 22.64 \pm 11.69\%$, $M2 = 21.72 \pm 10.69\%$, $M3 = 14.26 \pm 5.09\%$) 100:1 ($p = .331$, $M1 = 24.44 \pm 8.26\%$, $M2 = 22.76 \pm 9.04\%$, $M3 = 17.72 \pm 4.46\%$) und 500:1 ($p = .603$, $M1 = 29.93 \pm 10.05$, $M2 = 26.24 \pm 7.44\%$, $M3 = 25.59 \pm 5.11\%$), kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Lyserate von RMA-S festgestellt werden.

Für die drei Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte ($n = 5$) sowie die oben genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

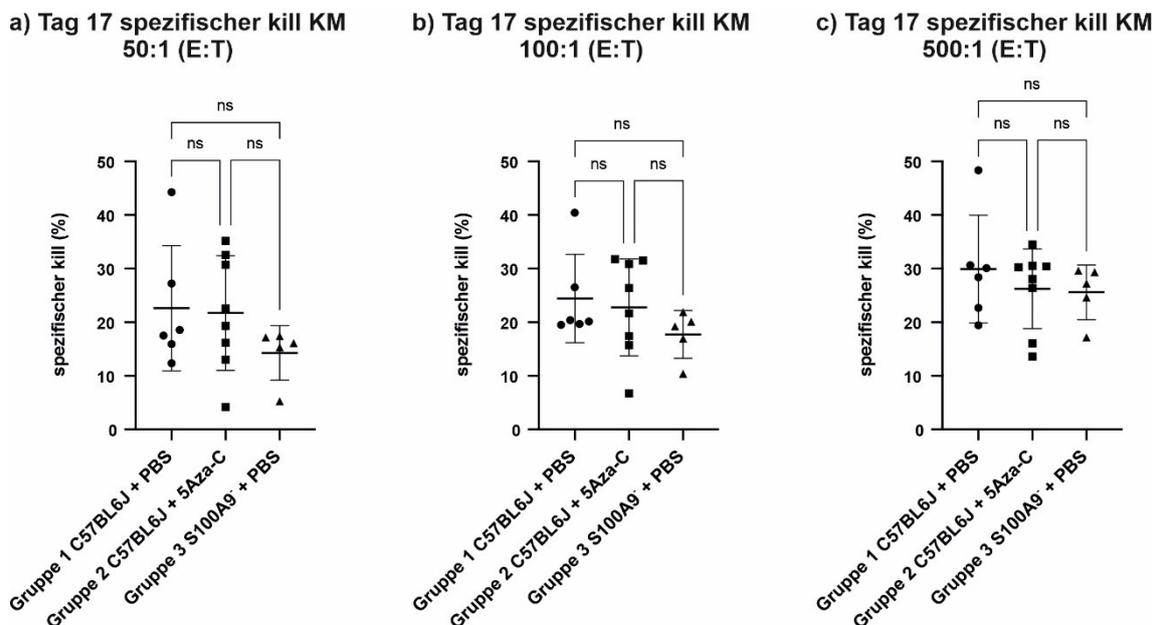


Abbildung 33: Spezifischer kill Knochenmark Tag 17

x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 17 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): Kruskal-Wallis Test

b) Tag 17 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): Kruskal-Wallis Test

c) Tag 17 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

Tag 21

Auch an Tag 21 konnte für keines der verwendeten E:T Verhältnisse ein signifikanter Unterschied in der Lyserate zwischen den Gruppen festgestellt

werden. Die Mittelwerte, begleitet von den entsprechenden Standardabweichungen, sowie die p-Werte für alle verwendeten E:T Verhältnisse können der folgenden Tabelle entnommen werden.

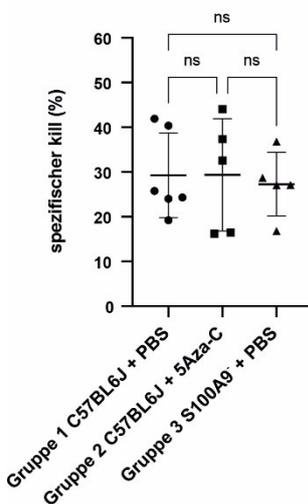
Tabelle 20: Spezifischer kill Knochenmark Tag 21

E:T	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
50:1	p = .932	26.74 ± 8.00%	29.35 ± 12.55%	27.29 ± 7.12%
100:1	p = .210	32.74 ± 6.58%	26.78 ± 7.06%	33.98 ± 7.12%
500:1	p = .0724	32.71 ± 5.29%	25.16 ± 4.67%	37.73 ± 10.93%

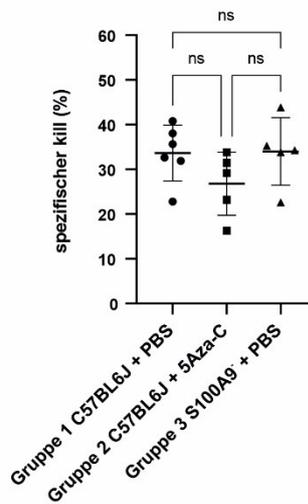
E:T = Effektor – Target Verhältnis

Für die drei Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte (n = 5) sowie die in der Tabelle genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

a) Tag 21 spezifischer kill KM
50:1 (E:T)



b) Tag 21 spezifischer kill KM
100:1 (E:T)



c) Tag 21 spezifischer kill KM
500:1 (E:T)

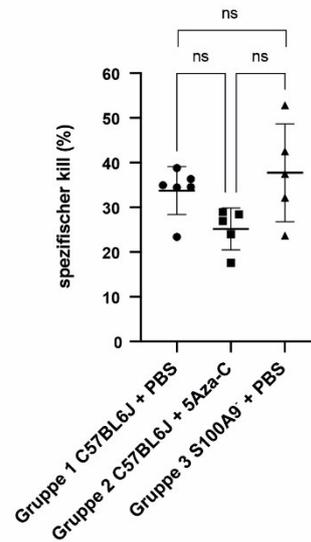


Abbildung 34: Spezifischer kill Knochenmark Tag 21

x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 21 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ANOVA

b) Tag 21 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

c) Tag 21 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): Kruskal-Wallis Test

Tag 28

Am 28. Tag nach subletaler Bestrahlung wurde für keines der verwendeten E:T Verhältnisse ein signifikanter Unterschied in der spezifischen kill Rate zwischen den Gruppen nachgewiesen. Die Mittelwerte, begleitet von den entsprechenden Standardabweichungen, sowie die p-Werte für alle verwendeten E:T Verhältnisse können der folgenden Tabelle entnommen werden.

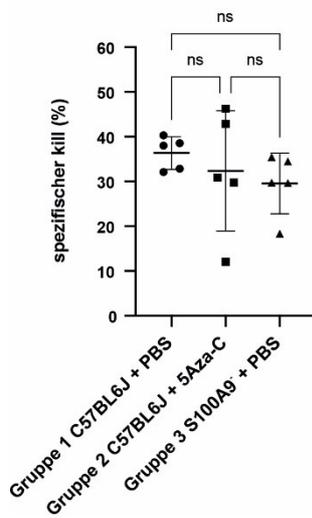
Tabelle 21: Spezifischer kill Knochenmark Tag 28

E:T	p-Wert	M1 ± SD1	M2 ± SD2	M3 ± SD3
50:1	p = .500	36.39 ± 3.65%	32.37 ± 13.46%	29.57 ± 6.78%
100:1	p = .999	38.99 ± 6.37%	36.71 ± 12.69%	37.72 ± 9.16%
500:1	p = .881	38.00 ± 6.62%	35.47 ± 10.19%	36.86 ± 6.32%

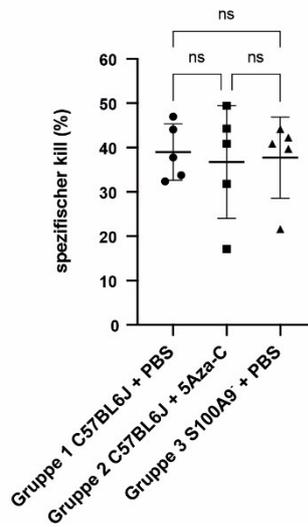
E:T = Effektor – Target Verhältnis

Für die drei Versuchsgruppen wurden für alle E:T Verhältnisse die jeweiligen Einzelwerte (n = 5) sowie die in der Tabelle genannten Mittelwerte mit zugehöriger Standardabweichung dargestellt.

a) Tag 28 spezifischer kill KM
50:1 (E:T)



b) Tag 28 spezifischer kill KM
100:1 (E:T)



c) Tag 28 spezifischer kill KM
500:1 (E:T)

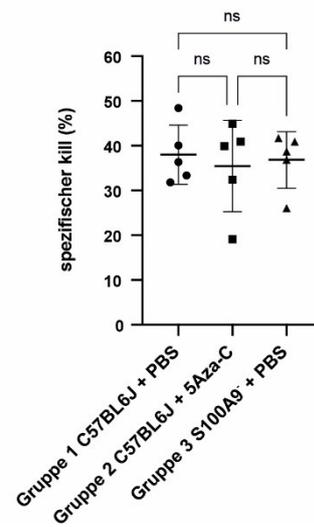


Abbildung 35: Spezifischer kill Knochenmark Tag 28

x-Achse: Gezeigt werden die drei Gruppen „Gruppe 1 C57BL/6J + PBS“ (links), „Gruppe 2 C57BL/6J + 5Aza-C (Mitte) und „Gruppe 3 S100A9^{-/-} + PBS“ (rechts).

y-Achse: Darstellung des spezifischen kills in % (für Berechnung siehe Teilversuch 3: Aktivitätsbestimmung NK Zellen).

a) Tag 28 spezifischer kill Milz 100:1 (E:T): ANOVA

b) Tag 28 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): Kruskal-Wallis Test

c) Tag 28 spezifischer kill Milz 500:1 (E:T): ANOVA

4. Diskussion

Die Resultate aus *Teilversuch 1: Einfluss von 5-AzaC auf die S100A8/A9 Konzentration im Serum* zeigen, dass eine niedrigdosierte Gabe von 5-AzaC im Rahmen der hämatopoetischen Rekonstitution zu erhöhten S100A8/A9 Proteinkonzentrationen im Serum an den frühen Untersuchungszeitpunkten, Tag 17 und Tag 21, führt. Dies lässt sich am ehesten auf durch die in den Vorarbeiten der AG André gezeigte Hypomethylierung der Promotorregion von S100A Proteinen mit nachfolgender vermehrter Expression durch 5-AzaC Gabe erklären. Daraus lässt sich schließen, dass eine niedrigdosierte Verabreichung von 5-AzaC zu einer zeitlich früher einsetzenden proinflammatorischen Immunreaktion führen könnte, die von S100A8/A9 Proteinen vermittelt wird. Allerdings wurde in dieser Arbeit kein kausaler Zusammenhang für diese Annahme nachgewiesen. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die niedrig dosierte 5-AzaC Gabe eine durch die initiale Bestrahlung bereits vorhandene Inflammationsreaktion verstärkt hat, die erst später von einer Erhöhung der S100A8/A9 Proteine begleitet wurde.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen Hinweise auf eine S100A8/A9-vermittelte Makrophagen - NK Zell Interaktion als Ursache der beschleunigten Regeneration der NK Zell Population. Die erhöhten S100A8/A9 Serumkonzentrationen an Tag 17 und 21 korrelieren auch mit erhöhten NK Zell Frequenzen zu diesen Untersuchungszeitpunkten im Sinne einer beschleunigten NK Zell Regeneration in dieser Gruppe. Dies wird zusätzlich durch die signifikant niedrigere NK Zell Frequenz in der Gruppe der *Knockout* Tiere an Tag 7 unterstützt. Allerdings wissen wir, dass NK Zellen selber kein S100A8/A9 sezernieren. Auch wenn wir keinen sicheren kausalen Beleg dafür haben, vermuten wir, dass die Interaktion von Monozyten und NK Zellen eine notwendige Voraussetzung für die Rekonstitution der NK Zellpopulation ist, die Interaktion von Monozyten und NK Zellen also die funktionelle Reifung der NK Zellen stimuliert.

Der in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe *in vitro* gezeigte erhöhte Anteil von Monozyten/DCs im Kultursystem konnte nicht bestätigt werden (Ginsberg und Zhao et al., Manuskript in Vorbereitung). Folglich lässt sich der Anstieg der

S100A8/A9 Konzentration nach 5-AzaC Gabe eher durch eine vermehrte Synthese von S100A8/A9 Proteinen in einzelnen Monozyten/Makrophagen, nicht aber durch eine erhöhte Frequenz von Makrophagen und reifen Monozyten erklären. Problematisch ist hierbei jedoch, dass der verwendete Oberflächenmarker F4/80 nur von reifen Monozyten und Makrophagen exprimiert wird (Francke et al., 2011). Unreife Vorläufer exprimieren F4/80 nur in geringem Maße oder gar nicht (Hirsch et al., 1981). Daher war eine Erfassung aller myeloiden Vorläufer, die für die Produktion von S100A8/A9 relevant sind, zu den frühen Analysezeitpunkten nicht möglich. Der frühe Anstieg der für die proinflammatorische Immunreaktion verantwortlichen S100A8/A9 Proteine nach 5-AzaC Gabe könnte demzufolge auf ein vermehrtes Auftreten unreifer Monozyten- und Makrophagen-Vorstufen zurückzuführen sein. Diese Zellen weisen noch keine F4/80 Expression auf, können aber bereits S100A8/A9 produzieren. Um die Rolle von S100A8/A9 in der Rekonstitution der Hämatopoese besser zu verstehen und eine eindeutige Verschiebung der Hämatopoese in Richtung Myelopoese/Granulopoese durch 5-AzaC zu belegen, sollten in zukünftigen *in vivo* Versuchen zusätzliche Oberflächenmarker zur Detektion von Monozyten- und Makrophagen-Vorstufen verwendet werden.

Zusätzlich zu den im Rahmen dieser Arbeit bereits verwendeten Markern zur Detektion von CMPs und GMPs, den sehr frühen Monozyten-Vorstufen, könnte in zukünftigen Untersuchungen die Expression von Ly6C bestimmt werden. Dieser Oberflächenmarker wird von *Common Monocyte Progenitors* (cMoP) und allen nachfolgenden Monozyten-Entwicklungsstufen exprimiert und eignet sich zudem zur Unterteilung der beiden Monozytenpopulationen Ly6C^{high} (inflammatorisch) und Ly6C^{low} (antiinflammatorisch), wobei letztere vermutlich aus ersterer hervorgeht (Hettinger et al., 2013, Terry and Miller, 2014, Geissmann et al., 2010, Sunderkötter et al., 2004). Mithilfe von CD115, einem Oberflächenmarker, der von Monozyten, Makrophagen, Osteoklasten sowie gemeinsamen Vorläuferzellen exprimiert wird, sollte zusätzlich eine klare Abgrenzung von Monozyten- und Makrophagen-Vorstufen zu Granulozyten und Lymphozyten erfolgen (Breslin et al., 2013).

Um zu überprüfen, ob die gezeigte vermehrte S100A8/A9 Produktion durch 5-AzaC Gabe auch auf eine vermehrte Synthese von S100A8/A9 Proteinen in einzelnen Monozyten/Makrophagen zurückzuführen sein könnte, wäre eine Korrelation mit der Monozytenfunktionalität sinnvoll. Denkbar wäre hier beispielsweise die Quantifizierung der Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, TNF- α oder IL-6 mittels ELISA (Serbina et al., 2008). Eine weitere etablierte Methode ist die Quantifizierung der oxidativen Burst-Aktivität der Monozyten über Messung der Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Fang, 2011). Mittels RT-PCR könnte zudem die Expression von Genen wie etwa des TLR4, dessen Aktivierung über NF- κ B eine Steigerung der Zytokinsekretion zur Folge hat, zur Beurteilung der Monozyten Aktivität herangezogen werden (Liu et al., 2017).

Neben der Untersuchung der Regeneration der Monozyten/Makrophagen Population ist auch die Betrachtung der Rekonstitution der Granulozyten Population unter 5-AzaC in zukünftigen Versuchen zu erwägen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass S100A8/A9 im Rahmen des *Remodelling* nach Herzinfarkt eine entscheidende Rolle in der Stimulation der Granulopoese spielt (Sreejit et al., 2020). Demzufolge wären in der S100A8/A9 *Knockout* Gruppe verringerte und in der 5-AzaC Gruppe erhöhte Granulozyten Zahlen zu erwarten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Rolle von S100A8/A9 für die Rekonstitution der Population der Neutrophilen Granulozyten aufgrund der Erfassung mehrerer Oberflächenmarker im selben FACS-Kanal nicht differenziert erfolgen.

Letztlich müssen aber die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten Daten zurückhaltend beurteilt und interpretiert werden, weil die Streuung, wie in vielen Mausexperimenten, hoch ist (wie etwa an Tag 28 in der Kontrollgruppe). Daher sollten meine Experimente zum einen in einer größeren Kohorte validiert werden, zum anderen würde das Einbeziehen zusätzlicher systemischer Inflammationsparameter, wie beispielsweise IL-6 oder TNF- α wertvolle Informationen geben.

Im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur konnte mittels 5-AzaC Gabe keine Verschiebung der Hämatopoese in Richtung der myeloischen Reihe

nachgewiesen werden (Bröske et al., 2009, Hodges et al., 2011). Auch konnte der unmittelbare Einfluss von S100A8/A9 auf die Myelopoese, speziell die fördernde Wirkung durch die Bindung an RAGE-Rezeptoren auf CMPs und Makrophagen, gefolgt von der Freisetzung von GM-CSF und G-CSF sowie der anschließenden Proliferation von Monozyten und Neutrophilen, weder durch signifikant höhere Zellfrequenzen in der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere noch durch signifikant niedrigere Zellfrequenzen dieser Populationen in der Gruppe der S100A8/A9 defizienten Tiere nachgewiesen werden (Nagareddy et al., 2013). Neuere Studien legen zudem nahe, dass die Verabreichung von G-CSF nach einer Stammzelltransplantation nicht nur die Vermehrung von Granulozyten fördert, sondern auch zu einer Steigerung des Anteils der CD56^{dim} NK Zellen führt, die entscheidend an GvL Reaktionen beteiligt sind (Minculescu et al., 2021, Dickinson et al., 2017, Melve et al., 2018). Hinsichtlich der generellen Auswirkungen von G-CSF auf die Proliferation von NK Zellen gibt es jedoch unterschiedliche Ergebnisse, die teilweise im Widerspruch zueinander stehen (Melve et al., 2018, Minculescu et al., 2021).

Es wäre folglich möglich, dass eine verstärkte endogene Freisetzung von G-CSF nach einer SZT aufgrund einer durch 5-AzaC ausgelösten Hochregulierung von S100A8/A9 in Monozyten und Makrophagen einen zusätzlichen Nutzen im posttransplantären *Setting* bieten könnte. Dies könnte sich in einer beschleunigten Rekonstitution der Granulozytenpopulation sowie in einer Hochregulierung der an GvL Reaktionen maßgeblich beteiligten zytotoxischen CD56^{dim} NK Zellen manifestieren.

Für eine abschließende Beurteilung der Rolle von S100A8/A9 in der frühen hämatopoetischen Differenzierung myeloischen Zellen werden aktuell von der AG André weitergehende Versuche durchgeführt, die unter anderem die Expression für die Hämatopoese der myeloischen Reihe relevanter Gene (wie beispielsweise *Csf3r*, *Csf1r*) und Transkriptionsfaktoren (wie beispielsweise *Pu.1*, *Gata-1*, *Cebpa*, *Irf8*, *Tal1*, *Runx1* u. *Gata-2*) von S100A9 *Knockout* Mäusen mit Kontrollmäusen vergleichen (Rosenbauer and Tenen, 2007).

Die hier dargestellten Daten bestätigen also Ergebnisse aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe, die zeigen, dass eine niedrig dosierte 5-AzaC Behandlung zu erhöhten Frequenzen von iNKs zu frühen Untersuchungszeitpunkten führt (Kübler et al., 2014, Woiterski et al., 2013) Allerdings gilt dies nur für sehr frühe Tage (Tag 7), nicht aber für spätere Zeitpunkte. Wir vermuten, dass hierfür Unterschiede in der Kinetik der murinen Hämatopoese (hier anhand von Daten aus C57BL/6J. Mäusen dargestellt) und der humanen Hämatopoese (in Kübler et al., 2014, anhand von humanisierten NSG Mäusen dargestellt) existieren. Da in den hier verwendeten C57BL/6J. Mäusen das gesamte komplexe Repertoire an Zytokinen und Wachstumsfaktoren vorhanden ist, während den humanisierten Mäusen lediglich exogenes IL7 zugeführt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass sich eine physiologische hämatopoetische Regeneration in C57BL/6J. Mäusen sehr viel rascher als in humanisierten NSG Mäusen einstellen kann. Dezierte Untersuchungen hierzu fehlen.

Passend zu der These, dass eine S100A8/A9 Expression die Differenzierung von NK Zellen fördert, ließen sich in den o.g. Experimenten höhere Anteile von lin⁻CD122⁺NK1.1⁺ NK Zellen in der Gruppe der mit 5-AzaC behandelten Tiere nachweisen. Ob diese auch funktionell aktiver sind, bleibt offen. Hierzu sind weitere Experimente geplant, in der *in vivo* RMA-S Tumore gesetzt werden, welche aufgrund ihrer MHC Klasse I Defizienz ideal von reifen NK Zellen eliminiert werden müssten.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Behandlung von NK Zellen mit 5-AzaC *in vitro*, sowohl von MDS-Patienten als auch von gesunden Spendern, zu einer erhöhten Funktionalität (Zytotoxizität gegen Zielzellen) und vermehrter IFN- γ Sekretion führt (Sohlberg et al., 2015). Letzteres deutet daraufhin, dass die NK Zell Population in reifere Stufen verschoben wird und passt zu den hier erhobenen Ergebnissen (Luetke-Eversloh et al., 2014). Interessant war jedoch, dass im Rahmen der Studie von Sohlberg et al. vor Gabe von 5-AzaC eine NK Zell Isolation stattfand. Folglich kann der im Rahmen dieser Studie beobachtete Effekt der Zellreifungsinduktion der NK Zell Population nicht, wie in der hier zu Beginn aufgestellten Hypothese vermutet, über eine S100A8/A9-vermittelte

Interaktion zwischen Makrophagen und NK Zellen erklärt werden. Vielmehr scheint er hier auf einer direkten Wirkung von 5-AzaC auf die NK Zellen selbst zurückzuführen sein. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschriebene epigenetische Kontrolle der KIR Expression von NK Zellen (Chan et al., 2003). Die Demethylierung CpG-Inseln, die die KIR-Gene umgeben, durch hypomethylierende Mittel wie 5-AzaC führt zu einer Transkriptionsinduktion und anschließender Zelloberflächenexpression dieser Gene (Santourlidis et al., 2002). Dies könnte den Gewinn an Funktionalität im Sinne einer direkten Wirkung von 5-AzaC auf NK Zellen erklären. Dieser Mechanismus konnte allerdings in Vorarbeiten der AG André in humanisierten NSG Mäusen nicht dokumentiert werden (Kübler et al., 2014), vielmehr war die KIR Expression in 5-AzaC behandelten und unbehandelten Kontrollmäusen gleich.

Auch in Bezug auf die NKG2A Expression wurde in einer anderen Arbeit gezeigt, dass 5-AzaC zu einer Hypomethylierung einer CpG reichen Region im NKG2A Gen von NK Zellen führt, was zu einer vermehrten Expression von NKG2A führt. Da NKG2A von mNKs exprimiert wird, jedoch nicht von iNKs, spricht dies für eine Verschiebung der Population hin zu reiferen Stufen durch 5-AzaC (Rogers et al., 2006).

Die in der Literatur zuvor beschriebene konsekutive Entwicklung der mNK Zellen ($CD11b^{low} CD27^{low} \rightarrow CD11b^{low} CD27^{high} \rightarrow CD11b^{high} CD27^{high} \rightarrow CD11b^{high} CD27^{low}$) (Chiossone et al., 2009) konnte in unserer Studie nicht nachgewiesen werden. Die Verteilung der vier Gruppen zeigte über alle Gruppen und Analysezeitpunkte hinweg keine signifikanten Unterschiede. $CD11b^{high} CD27^{low}$ mNK Zellen, die die finale Entwicklungsstufe repräsentieren und laut Chiossone et al. zwischen Tag 14 und 28 den größten Anteil der mNK Zellen ausmachen, konnten zu keinem Analysezeitpunkt in relevanten Mengen nachgewiesen werden. Dies galt auch, wenn das *Pregating* weggelassen wurde. Selbst in späteren Versuchen der Arbeitsgruppe und unter Verwendung von Antikörpern unterschiedlicher Hersteller konnte eine vierstufige Entwicklung der NK Zellen nie beobachtet werden. Daher lässt sich keine Aussage über den Einfluss von 5-

AzaC und S100A8/A9 auf die Ausreifung von NK Zellen treffen. Die Ursache dieser Diskrepanz zwischen in der Literatur beschriebenen phänotypischen Reifungsstufen und unseren Befunden ist derzeit nicht klar. Da aber Folgeuntersuchungen der Arbeitsgruppe zu gleichen Ergebnissen führten, erscheint ein experimenteller Fehler unwahrscheinlich. Denkbar wäre es, dass unterschiedliche Antigenstrukturen von den in der Literatur und den von uns eingesetzten Antikörpern erkannt werden. Ausreichende Informationen zu den Antigenen bzw. Antigenanteilen, welche zur Generierung der Antikörper eingesetzt wurden, liegen uns allerdings nicht vor.

Ein ähnliches Ergebnis wie bei der Betrachtung der Rekonstitution der NK Zell Population zeigte sich bei der Untersuchung der Funktionalität. Es konnte, wie erwartet, gezeigt werden, dass eine niedrigdosierte 5-AzaC Gabe zu einem früheren Funktionalitätserwerb im Sinne einer gesteigerten *ex vivo* Zytotoxizität gegen RMA-S führt. Um zukünftig jedoch zu beweisen, dass der gezeigte Effekt auf der vermuteten Interaktion von Makrophagen und NK Zellen über S100A8/A9 beruht, wäre zusätzlich zur initialen subletalen Bestrahlung eine Makrophagen Depletion mit anschließender Untersuchung der NK Zell Rekonstitution notwendig.

In vivo Daten aus der Literatur zeigen, dass S100A8/A9 über den RAGE-Signalweg die Aktivierung und Proliferation von NK Zellen direkt fördern kann, was zu einer erheblichen Verringerung des Tumorwachstums führt (Narumi et al., 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass es nach einer S100A8/A9-vermittelten Aktivierung des RAGE-Signalwegs zu einer vermehrten IFN- γ Produktion durch die NK Zellen kommt (Narumi et al., 2015). Dies wiederum führt im Sinne einer positiven Rückkopplung zu einer Freisetzung von Zytokinen wie TNF- α , IL-1 und IL-6 durch Makrophagen und schafft ein inflammatorisches Milieu (Narumi et al., 2015, Arango Duque and Descoteaux, 2014). Ein Fehlen von S100A8/A9 Proteinen sollte sich daher, anders als in den hier erhobenen Daten, eher nachteilig auf die NK Zell Funktionalität auswirken. Da dieser Effekt

nicht gezeigt werden konnte, ist es also durchaus denkbar, dass die NK Zellfunktionalität gar nicht maßgeblich durch S100A8/A9 beeinflusst wird.

Es sollte zudem in Betracht gezogen werden, ob es bei einzelnen Tieren in der *Knockout* Gruppe im Rahmen der Inflammationsreaktion durch die initiale subletale Bestrahlung zu einer Erholung von S100A8 Protein und folglich zur Bildung von S100A8 Homodimeren gekommen sein könnte. Dies ließe sich durch einen S100A8 *Western Blot* verifizieren und würde möglicherweise erklären, warum der S100A9 *Genknockout* in Bezug auf oben genannte Aspekte keinen nachteiligen Effekt zeigte.

Letztlich stellen die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätstests lediglich einen kleinen Teil der NK Zell-vermittelten Tumorantwort gegen RMA-S dar. Es ist bekannt, dass *in vivo* viele weitere Elemente, wie beispielsweise die Interaktion von Monozyten und T- und B-Zellen, aber auch das Zytokinmilieu eine wichtige Rolle in der Anti-Tumorantwort spielen. Um die Anti-Tumorantwort und die Auswirkungen von 5-AzaC auf das den Tumor umgebende inflammatorische Mikromilieu *in vivo* besser zu verstehen, laufen bereits Tumorinduktionsversuche, in denen RMA-S Zellen s.c. injiziert werden. Die Arbeitsgruppe erwartet davon weitere Erkenntnisse, die zu einem besseren Verständnis der Interaktion von Monozyten und NK Zellen beitragen können.

Bedacht werden muss zudem, dass in den hier durchgeführten Versuchen IL-15 lediglich zur Aktivierung der NK Zellen *in vitro*, jedoch nicht *in vivo*, eingesetzt wurde. Dieses Zytokin ist - sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen - das wichtigste Molekül in der Steuerung der Differenzierung, des Überlebens und der Funktionalität von NK Zellen. Es wird üblicherweise zusammen mit seinem Rezeptor (Transpräsentation) appliziert, da es in diesem Komplex besonders gut an die Sushi Domäne des IL-15 Rezeptors binden kann (Huntington, 2014). Gegenwärtig wird davon ausgegangen, dass jede NK Zell-basierte Immuntherapie auch die Gabe von IL15/IL15R beinhalten muss. Es ist denkbar, dass in dem hier skizzierten und untersuchten Mausmodell die endogenen

Spiegel von IL15 unzureichend waren. Daher wiederholt die Arbeitsgruppe derzeit die o.g. Experimente mit gleichzeitiger Supplementation von IL15.

Ein weiteres, von der Arbeitsgruppe bereits adressiertes Problem ist eine potenziell zu hoch oder zu niedrig gewählte Konzentration von 5-AzaC. Da die hypomethylierende Wirkung von 5-AzaC auf proliferierende Zellen beschränkt ist und bereits beschrieben wurde, dass die Metabolisierung von 5-AzaC zumindest in Kaninchen deutlich schneller als im Menschen verläuft, ist es nicht auszuschließen, dass der zeitliche Abstand zwischen den Applikationen zu groß und die Anzahl der Applikationen zu gering gewählt wurde (Sohlberg et al., 2015, Stresemann and Lyko, 2008). Es gilt jedoch zu beachten, dass höhere Mengen an 5-AzaC toxisch auf reife NK Zellen wirkt und deren Funktionalität beeinträchtigt (Schmiedel et al., 2011). Im Moment laufen daher weitere *in vivo* Versuche zur Bestimmung der optimalen Injektionsfrequenz und Dosierung von 5-AzaC.

Als generelle Limitation der hier durchgeführten Versuche muss die niedrige Stichprobengröße in Verbindung mit erheblichen interindividuellen Unterschieden und daraus resultierenden hohen Standardabweichungen genannt werden. Daher können aktuell nur Tendenzen beschrieben werden, jedoch sind definitive Aussagen nicht möglich. Im Rahmen der bereits laufenden Tumorinduktionsversuche werden daher größere Stichprobengrößen (n=10) verwendet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine niedrigdosierte 5-AzaC Gabe während der frühen Phase der hämatopoetischen Rekonstitution zu einer Inflammationsreaktion und einem Anstieg der S100A8/A9 Konzentration im Serum führt. Dieses Phänomen geht mit einer beschleunigten Regeneration der NK Zellpopulation mit erhöhten Frequenzen in den frühen Untersuchungszeiträumen und früherem Funktionalitätserwerb im Sinne einer gesteigerten Zytotoxizität gegen RMA-S einher. Ob der beobachtete Effekt tatsächlich auf einer S100A8/A9-vermittelten Interaktion von Monozyten und NK Zellen beruht oder auf einer direkten Wirkung von 5-AzaC auf NK Zellen, kann ohne weitere Versuche wie Depletion der Interaktion, oder Blockade der

S100A8/A9 Wirkung nicht abschließend geklärt werden. Um zu zeigen, dass eine 5-AzaC-vermittelte Zunahme der S100A8/A9 Expression zu einer Verschiebung der Hämatopoese in Richtung der myeloischen Reihe mit erhöhten Frequenzen von Makrophagen führt, werden bereits Versuche durchgeführt, die unter anderem die Expression für die Hämatopoese relevanter Gene und Transkriptionsfaktoren von S100A9 *Knockout* Mäusen mit Kontrollmäusen vergleichen. Zur besseren Illustration der NK Zell *in vivo* Funktionalität im inflammatorischen Tumormilieu laufen bereits Tumorinduktionsversuche.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die durch NK Zellen verursachten Graft-versus-Leukämie Effekte (GvL) spielen eine entscheidende Rolle bei der Beseitigung minimaler Resterkrankungen der Leukämie nach allogener Stammzelltransplantation (SZT).

Die initial aufgestellte Hypothese sagt, dass eine durch 5-AzaC induzierte und durch S100A-Proteine vermittelte Inflammationsreaktion die Vorläuferbildung der NK Zellen nach Stammzelltransplantation fördert und deren antitumorale Wirkung in der frühen posttransplantären Phase als innovatives Therapiekonzept zur Verstärkung von GvL-Effekten dienen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass eine niedrigdosierte Gabe von 5-AzaC nach subletaler Bestrahlung zu erhöhten S100A8/A9 Proteinkonzentrationen im Serum an den frühen Untersuchungszeitpunkten, Tag 17 und Tag 21, führte.

Zudem konnte eine beschleunigte Rekonstitution der NK Zellpopulation unter 5-AzaC-Gabe beobachtet werden. Diese war mit einem früherem Funktionalitätserwerb verbunden, was sich in einer erhöhten Zytotoxizität gegenüber der Zielzelllinie RMA-S äußerte. Nicht abschließend geklärt werden konnte, ob der gezeigte Effekt tatsächlich auf einer Monozyten-vermittelten NK Zell Stimulation oder auf einer direkten Wirkung von 5-AzaC auf NK Zellen beruht. Für ein besseres Verständnis der Monozyten - NK Zell Interaktion über S100A Proteine im inflammatorischen Tumormikromilieu laufen bereits Tumorinduktionsversuche. Im Rahmen dieser Versuche ist auch eine Bestimmung der optimalen Dosierungsintervalle sowie der Gesamtdosis geplant.

Eine Verschiebung der Hämatopoese in Richtung der myeloischen Reihe durch die hypomethylierende Wirkung von 5-AzaC konnte nicht gezeigt werden. Um die Rolle von S100A9 in der frühen myeloiden und lymphoiden Differenzierung besser zu verstehen, werden von der AG André aktuell weitergehende Versuche durchgeführt, die unter anderem die Expression für die Hämatopoese relevanter Gene und Transkriptionsfaktoren von S100A9 *Knockout* Mäusen mit Kontrollmäusen vergleichen.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit weitere Hinweise auf eine Intensivierung der frühen GvL-Effekte zur Beseitigung der minimalen Leukämiereste durch die niedrig dosierte Gabe von 5-AzaC, ohne den zugrunde liegenden Mechanismus abschließend klären zu können.

6. Literaturverzeichnis

- ABEL, A. M., YANG, C., THAKAR, M. S. & MALARKANNAN, S. 2018. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Frontiers in Immunology*, 9.
- ADOLFSSON, J., MÅNSSON, R., BUZA-VIDAS, N., HULTQUIST, A., LIUBA, K., JENSEN, C. T., BRYDER, D., YANG, L., BORGE, O.-J., THOREN, L. A. M., ANDERSON, K., SITNICKA, E., SASAKI, Y., SIGVARDSSON, M. & JACOBSEN, S. E. W. 2005a. Identification of Flt3⁺ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential: A Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment. *Cell*, 121, 295-306.
- ADOLFSSON, J., MANSSON, R., BUZA-VIDAS, N., HULTQUIST, A., LIUBA, K., JENSEN, C. T., BRYDER, D., YANG, L., BORGE, O. J., THOREN, L. A., ANDERSON, K., SITNICKA, E., SASAKI, Y., SIGVARDSSON, M. & JACOBSEN, S. E. 2005b. Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 121, 295-306.
- AKASHI, K., TRAVER, D., KONDO, M. & WEISSMAN, I. L. 1999. Lymphoid development from hematopoietic stem cells. *Int J Hematol*, 69, 217-26.
- AKASHI, K., TRAVER, D., MIYAMOTO, T. & WEISSMAN, I. L. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*, 404, 193-7.
- ANTONANGELI, F., ZINGONI, A., SORIANI, A. & SANTONI, A. 2019. Senescent cells: Living or dying is a matter of NK cells. *J Leukoc Biol*, 105, 1275-1283.
- ARANGO DUQUE, G. & DESCOTEAUX, A. 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Front Immunol*, 5, 491.
- ARASE, H., SAITO, T., PHILLIPS, J. H. & LANIER, L. L. 2001. Cutting Edge: The Mouse NK Cell-Associated Antigen Recognized by DX5 Monoclonal Antibody is CD49b (α ₂ Integrin, Very Late Antigen-2). *The Journal of Immunology*, 167, 1141-1144.
- ARINOBU, Y., MIZUNO, S.-I., CHONG, Y., SHIGEMATSU, H., IINO, T., IWASAKI, H., GRAF, T., MAYFIELD, R., CHAN, S., KASTNER, P. & AKASHI, K. 2007. Reciprocal Activation of GATA-1 and PU.1 Marks Initial Specification of Hematopoietic Stem Cells into Myeloerythroid and Myelolymphoid Lineages. *Cell Stem Cell*, 1, 416-427.
- BARROW, A. D., MARTIN, C. J. & COLONNA, M. 2019. The Natural Cytotoxicity Receptors in Health and Disease. *Front Immunol*, 10, 909.
- BECKNELL, B. & CALIGIURI, M. A. 2005. Interleukin-2, Interleukin-15, and Their Roles in Human Natural Killer Cells. In: ALT, F. W. (ed.) *Advances in Immunology*. Academic Press.
- BEJANYAN, N., WEISDORF, D. J., LOGAN, B. R., WANG, H.-L., DEVINE, S. M., DE LIMA, M., BUNJES, D. W. & ZHANG, M.-J. 2015. Survival of Patients with Acute Myeloid Leukemia Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation: A Center for International Blood and Marrow Transplant Research Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21, 454-459.

- BERGY, M. E. & HERR, R. R. 1966. Microbiological production of 5-azacytidine. II. Isolation and chemical structure. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)*, 6, 625-30.
- BIRON, C. A. 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr Opin Immunol*, 9, 24-34.
- BOOS, M. D., YOKOTA, Y., EBERL, G. & KEE, B. L. 2007. Mature natural killer cell and lymphoid tissue-inducing cell development requires Id2-mediated suppression of E protein activity. *J Exp Med*, 204, 1119-30.
- BOULAIS, P. E. & FRENETTE, P. S. 2015. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood*, 125, 2621-9.
- BOYD, J. H., KAN, B., ROBERTS, H., WANG, Y. & WALLEY, K. R. 2008. S100A8 and S100A9 mediate endotoxin-induced cardiomyocyte dysfunction via the receptor for advanced glycation end products. *Circ Res*, 102, 1239-46.
- BRESLIN, W. L., STROHACKER, K., CARPENTER, K. C., HAVILAND, D. L. & MCFARLIN, B. K. 2013. Mouse blood monocytes: standardizing their identification and analysis using CD115. *J Immunol Methods*, 390, 1-8.
- BRÖSKE, A. M., VOCKENTANZ, L., KHARAZI, S., HUSKA, M. R., MANCINI, E., SCHELLER, M., KUHL, C., ENNS, A., PRINZ, M., JAENISCH, R., NERLOV, C., LEUTZ, A., ANDRADE-NAVARRO, M. A., JACOBSEN, S. E. & ROSENBAUER, F. 2009. DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction. *Nat Genet*, 41, 1207-15.
- CHALLEN, G. A., BOLES, N., LIN, K. K. & GOODELL, M. A. 2009. Mouse hematopoietic stem cell identification and analysis. *Cytometry A*, 75, 14-24.
- CHAN, H. W., KURAGO, Z. B., STEWART, C. A., WILSON, M. J., MARTIN, M. P., MACE, B. E., CARRINGTON, M., TROWSDALE, J. & LUTZ, C. T. 2003. DNA methylation maintains allele-specific KIR gene expression in human natural killer cells. *J Exp Med*, 197, 245-55.
- CHEN, B., MILLER, A. L., REBELATTO, M., BREWAH, Y., ROWE, D. C., CLARKE, L., CZAPIGA, M., ROSENTHAL, K., IMAMICHI, T., CHEN, Y., CHANG, C. S., CHOWDHURY, P. S., NAIMAN, B., WANG, Y., YANG, D., HUMBLE, A. A., HERBST, R. & SIMS, G. P. 2015. S100A9 induced inflammatory responses are mediated by distinct damage associated molecular patterns (DAMP) receptors in vitro and in vivo. *PLoS One*, 10, e0115828.
- CHIOSSONE, L., CHAIX, J., FUSERI, N., ROTH, C., VIVIER, E. & WALZER, T. 2009. Maturation of mouse NK cells is a 4-stage developmental program. *Blood*, 113, 5488-96.
- CHRISTMAN, J. K., MENDELSON, N., HERZOG, D. & SCHNEIDERMAN, N. 1983. Effect of 5-azacytidine on differentiation and DNA methylation in human promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Cancer Res*, 43, 763-9.
- CIHÁK, A. 1974. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology*, 30, 405-22.
- CLAUS, M., GREIL, J. & WATZL, C. 2009. Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods*, 341, 154-64.

- COOPER, M. A., BUSH, J. E., FEHNIGER, T. A., VANDEUSEN, J. B., WAITE, R. E., LIU, Y., AGUILA, H. L. & CALIGIURI, M. A. 2002. In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells. *Blood*, 100, 3633-8.
- COOPER, M. A., FEHNIGER, T. A. & CALIGIURI, M. A. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*, 22, 633-40.
- CREUSOT, F., ACS, G. & CHRISTMAN, J. K. 1982. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem*, 257, 2041-8.
- DALE, I., BRANDTZAEG, P., FAGERHOL, M. K. & SCOTT, H. 1985. Distribution of a New Myelomonocytic Antigen (L1) in Human Peripheral Blood Leukocytes: Immunofluorescence and Immunoperoxidase Staining Features in Comparison with Lysozyme and Lactoferrin. *American Journal of Clinical Pathology*, 84, 24-34.
- DAUSSY, C., FAURE, F., MAYOL, K., VIEL, S., GASTEIGER, G., CHARRIER, E., BIENVENU, J., HENRY, T., DEBIEN, E., HASAN, U. A., MARVEL, J., YOH, K., TAKAHASHI, S., PRINZ, I., DE BERNARD, S., BUFFAT, L. & WALZER, T. 2014. T-bet and Eomes instruct the development of two distinct natural killer cell lineages in the liver and in the bone marrow. *J Exp Med*, 211, 563-77.
- DESPOIX, N., WALZER, T., JOUVE, N., BLOT-CHABAUD, M., BARDIN, N., PAUL, P., LYONNET, L., VIVIER, E., DIGNAT-GEORGE, F. & VÉLY, F. 2008. Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. *European Journal of Immunology*, 38, 2855-2864.
- DI SANTO, J. P. 2006. NATURAL KILLER CELL DEVELOPMENTAL PATHWAYS: A Question of Balance. *Annual Review of Immunology*, 24, 257-286.
- DICKINSON, A. M., NORDEN, J., LI, S., HROMADNIKOVA, I., SCHMID, C., SCHMETZER, H. & JOCHEM-KOLB, H. 2017. Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol*, 8, 496.
- ELMAAGACLI, A. H., STECKEL, N. K., KOLDEHOFF, M., HEGERFELDT, Y., TRENSCHEL, R., DITSCHKOWSKI, M., CHRISTOPH, S., GROMKE, T., KORDELAS, L., OTTINGER, H. D., ROSS, R. S., HORN, P. A., SCHNITTGER, S. & BEELEN, D. W. 2011. Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients. *Blood*, 118, 1402-12.
- ESTELLER, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Human Molecular Genetics*, 16, R50-R59.
- FANG, F. C. 2011. Antimicrobial actions of reactive oxygen species. *mBio*, 2.
- FATHMAN, J. W., BHATTACHARYA, D., INLAY, M. A., SEITA, J., KARSUNKY, H. & WEISSMAN, I. L. 2011. Identification of the earliest natural killer cell-committed progenitor in murine bone marrow. *Blood*, 118, 5439-47.
- FEHNIGER, T. A., CAI, S. F., CAO, X., BREDEMEYER, A. J., PRESTI, R. M., FRENCH, A. R. & LEY, T. J. 2007. Acquisition of murine NK cell

- cytotoxicity requires the translation of a pre-existing pool of granzyme B and perforin mRNAs. *Immunity*, 26, 798-811.
- FENAUX, P., MUFTI, G. J., HELLSTROM-LINDBERG, E., SANTINI, V., FINELLI, C., GIAGOUNIDIS, A., SCHOCH, R., GATTERMANN, N., SANZ, G., LIST, A., GORE, S. D., SEYMOUR, J. F., BENNETT, J. M., BYRD, J., BACKSTROM, J., ZIMMERMAN, L., MCKENZIE, D., BEACH, C. & SILVERMAN, L. R. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10, 223-32.
- FERNANDO, S. A., SPORTSMAN, J. R. & WILSON, G. S. 1992. Studies of the low dose 'hook' effect in a competitive homogeneous immunoassay. *J Immunol Methods*, 151, 27-46.
- FOELL, D., WITTKOWSKI, H., VOGL, T. & ROTH, J. 2007. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*, 81, 28-37.
- FOLEY, B., COOLEY, S., VERNERIS, M. R., CURTSINGER, J., LUO, X., WALLER, E. K., WEISDORF, D. J. & MILLER, J. S. 2011. NK cell education after allogeneic transplantation: dissociation between recovery of cytokine-producing and cytotoxic functions. *Blood*, 118, 2784-92.
- FRANCKE, A., HEROLD, J., WEINERT, S., STRASSER, R. H. & BRAUN-DULLAEUS, R. C. 2011. Generation of mature murine monocytes from heterogeneous bone marrow and description of their properties. *J Histochem Cytochem*, 59, 813-25.
- FREUD, A. G., BECKNELL, B., ROYCHOWDHURY, S., MAO, H. C., FERKETICH, A. K., NUOVO, G. J., HUGHES, T. L., MARBURGER, T. B., SUNG, J., BAIOCCHI, R. A., GUIMOND, M. & CALIGIURI, M. A. 2005. A Human CD34(+) Subset Resides in Lymph Nodes and Differentiates into CD56^{bright} Natural Killer Cells. *Immunity*, 22, 295-304.
- FREUD, A. G., YOKOHAMA, A., BECKNELL, B., LEE, M. T., MAO, H. C., FERKETICH, A. K. & CALIGIURI, M. A. 2006. Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *The Journal of experimental medicine*, 203, 1033-1043.
- FRIEDMAN, S. 1981. The inhibition of DNA(cytosine-5)methylases by 5-azacytidine. The effect of azacytosine-containing DNA. *Mol Pharmacol*, 19, 314-20.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327, 656-61.
- GHAVAMI, S., RASHEDI, I., DATTILO, B. M., ESHRAGHI, M., CHAZIN, W. J., HASHEMI, M., WESSELBORG, S., KERKHOFF, C. & LOS, M. 2008. S100A8/A9 at low concentration promotes tumor cell growth via RAGE ligation and MAP kinase-dependent pathway. *Journal of Leukocyte Biology*, 83, 1484-1492.
- GOH, W. & HUNTINGTON, N. D. 2017. Regulation of Murine Natural Killer Cell Development. *Front Immunol*, 8, 130.

- GREEN, M. L., LEISENRING, W. M., XIE, H., WALTER, R. B., MIELCAREK, M., SANDMAIER, B. M., RIDDELL, S. R. & BOECKH, M. 2013. CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia. *Blood*, 122, 1316-24.
- GRÉGOIRE, C., CHASSON, L., LUCI, C., TOMASELLO, E., GEISSMANN, F., VIVIER, E. & WALZER, T. 2007. The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews*, 220, 169-182.
- GRZYWACZ, B., KATARIA, N., SIKORA, M., OOSTENDORP, R. A., DZIERZAK, E. A., BLAZAR, B. R., MILLER, J. S. & VERNERIS, M. R. 2006. Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood*, 108, 3824-33.
- HERMAN, J. G. & BAYLIN, S. B. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*, 349, 2042-54.
- HETTINGER, J., RICHARDS, D. M., HANSSON, J., BARRA, M. M., JOSCHKO, A. C., KRIJGSVELD, J. & FEUERER, M. 2013. Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol*, 14, 821-30.
- HIRSCH, S., AUSTYN, J. M. & GORDON, S. 1981. Expression of the macrophage-specific antigen F4/80 during differentiation of mouse bone marrow cells in culture. *J Exp Med*, 154, 713-25.
- HOBBS, J. A., MAY, R., TANOUSIS, K., MCNEILL, E., MATHIES, M., GEBHARDT, C., HENDERSON, R., ROBINSON, M. J. & HOGG, N. 2003. Myeloid cell function in MRP-14 (S100A9) null mice. *Mol Cell Biol*, 23, 2564-76.
- HODGES, E., MOLARO, A., DOS SANTOS, C. O., THEKKAT, P., SONG, Q., UREN, P. J., PARK, J., BUTLER, J., RAFII, S., MCCOMBIE, W. R., SMITH, A. D. & HANNON, G. J. 2011. Directional DNA methylation changes and complex intermediate states accompany lineage specificity in the adult hematopoietic compartment. *Mol Cell*, 44, 17-28.
- HOROWITZ, M., SCHREIBER, H., ELDER, A., HEIDENREICH, O., VORMOOR, J., TOFFALORI, C., VAGO, L. & KRÖGER, N. 2018. Epidemiology and biology of relapse after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 53, 1379-1389.
- HUNTINGTON, N. D. 2014. The unconventional expression of IL-15 and its role in NK cell homeostasis. *Immunol Cell Biol*, 92, 210-3.
- HUNTINGTON, N. D., TABARIAS, H., FAIRFAX, K., BRADY, J., HAYAKAWA, Y., DEGLI-ESPOSTI, M. A., SMYTH, M. J., TARLINTON, D. M. & NUTT, S. L. 2007. NK Cell Maturation and Peripheral Homeostasis Is Associated with KLRG1 Up-Regulation. *The Journal of Immunology*, 178, 4764-4770.
- ISSA, J.-P. 2005. Optimizing therapy with methylation inhibitors in myelodysplastic syndromes: dose, duration, and patient selection. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2, S24-S29.
- JACOBS, R., HINTZEN, G., KEMPER, A., BEUL, K., KEMPF, S., BEHRENS, G., SYKORA, K. W. & SCHMIDT, R. E. 2001. CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *Eur J Immunol*, 31, 3121-7.

- JIANG, Y. Z., BARRETT, A. J., GOLDMAN, J. M. & MAVROUDIS, D. A. 1997. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*, 74, 1-6.
- JONES, P. A., TAYLOR, S. M. & WILSON, V. L. 1983. Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Recent Results Cancer Res*, 84, 202-11.
- KAMINSKAS, E., FARRELL, A. T., WANG, Y.-C., SRIDHARA, R. & PAZDUR, R. 2005. FDA Drug Approval Summary: Azacitidine (5-azacytidine, Vidaza™) for Injectable Suspension. *The Oncologist*, 10, 176-182.
- KARED, H., MARTELLI, S., NG, T. P., PENDER, S. L. & LARBI, A. 2016. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 65, 441-52.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2007. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 13, 460-9.
- KELLY, S. E., JONES, D. B. & FLEMING, S. 1989. Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. *J Pathol*, 159, 17-21.
- KIESSLING, R., KLEIN, E. & WIGZELL, H. 1975. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol*, 5, 112-7.
- KIM, S., IIZUKA, K., KANG, H. S., DOKUN, A., FRENCH, A. R., GRECO, S. & YOKOYAMA, W. M. 2002. In vivo developmental stages in murine natural killer cell maturation. *Nat Immunol*, 3, 523-8.
- KLOSE, C. S. N., FLACH, M., MÖHLE, L., ROGELL, L., HOYLER, T., EBERT, K., FABIUNKE, C., PFEIFER, D., SEXL, V., FONSECA-PEREIRA, D., DOMINGUES, R. G., VEIGA-FERNANDES, H., ARNOLD, S. J., BUSSLINGER, M., DUNAY, I. R., TANRIVER, Y. & DIEFENBACH, A. 2014. Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. *Cell*, 157, 340-356.
- KONDO, M., WEISSMAN, I. L. & AKASHI, K. 1997a. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 91, 661-72.
- KONDO, M., WEISSMAN, I. L. & AKASHI, K. 1997b. Identification of Clonogenic Common Lymphoid Progenitors in Mouse Bone Marrow. *Cell*, 91, 661-672.
- KORNDÖRFER, I. P., BRUECKNER, F. & SKERRA, A. 2007. The crystal structure of the human (S100A8/S100A9)₂ heterotetramer, calprotectin, illustrates how conformational changes of interacting alpha-helices can determine specific association of two EF-hand proteins. *J Mol Biol*, 370, 887-98.
- KRAUSE, D. S., ITO, T., FACKLER, M. J., SMITH, O. M., COLLECTOR, M. I., SHARKIS, S. J. & MAY, W. S. 1994. Characterization of murine CD34, a marker for hematopoietic progenitor and stem cells. *Blood*, 84, 691-701.
- KU, J. L., JEON, Y. K. & PARK, J. G. 2011. Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol*, 791, 23-32.
- KÜBLER, A., WOITERSKI, J., WITTE, K.-E., BÜHRING, H.-J., HARTWIG, U. F., EBINGER, M., OEVERMANN, L., MEZGER, M., HERR, W., LANG, P., HANDGRETINGER, R., MÜNZ, C. & ANDRÉ, M. C. 2014. Both mature KIR⁺ and immature KIR⁻ NK cells control pediatric acute B-cell

- precursor leukemia in NOD.Cg-Prkdcscid IL2rgtmWjl/Sz mice. *Blood*, 124, 3914-3923.
- LAOUEDJ, M., TARDIF, M. R., GIL, L., RAQUIL, M. A., LACHHAB, A., PELLETIER, M., TESSIER, P. A. & BARABÉ, F. 2017. S100A9 induces differentiation of acute myeloid leukemia cells through TLR4. *Blood*, 129, 1980-1990.
- LEŚNIAK, W. 2011. Epigenetic regulation of S100 protein expression. *Clinical Epigenetics*, 2, 77-83.
- LEŚNIAK, W., SŁOMNICKI Ł, P. & KUŹNICKI, J. 2007. Epigenetic control of the S100A6 (calcylin) gene expression. *J Invest Dermatol*, 127, 2307-14.
- LEUKERT, N., SORG, C. & ROTH, J. 2005. Molecular basis of the complex formation between the two calcium-binding proteins S100A8 (MRP8) and S100A9 (MRP14). 386, 429-434.
- LEUKERT, N., VOGL, T., STRUPAT, K., REICHEL, R., SORG, C. & ROTH, J. 2006. Calcium-dependent tetramer formation of S100A8 and S100A9 is essential for biological activity. *J Mol Biol*, 359, 961-72.
- LI, L. H., OLIN, E. J., BUSKIRK, H. H. & REINEKE, L. M. 1970. Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res*, 30, 2760-9.
- LIEBERMAN, J. 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol*, 3, 361-70.
- LIU, T., ZHANG, L., JOO, D. & SUN, S. C. 2017. NF-κB signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*, 2, 17023-.
- LJUNGGREN, H. G., PAABO, S., COCHET, M., KLING, G., KOURILSKY, P. & KARRE, K. 1989. Molecular analysis of H-2-deficient lymphoma lines. Distinct defects in biosynthesis and association of MHC class I heavy chains and beta 2-microglobulin observed in cells with increased sensitivity to NK cell lysis. *J Immunol*, 142, 2911-7.
- LUC, S., BUZA-VIDAS, N. & JACOBSEN, S. E. W. 2008. Delineating the cellular pathways of hematopoietic lineage commitment. *Seminars in Immunology*, 20, 213-220.
- LUETKE-EVERSLÖH, M., CICEK, B. B., SIRACUSA, F., THOM, J. T., HAMANN, A., FRISCHBUTTER, S., BAUMGRASS, R., CHANG, H. D., THIEL, A., DONG, J. & ROMAGNANI, C. 2014. NK cells gain higher IFN-γ competence during terminal differentiation. *Eur J Immunol*, 44, 2074-84.
- LYONS, A. B. & PARISH, C. R. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods*, 171, 131-7.
- MA, L., SUN, P., ZHANG, J. C., ZHANG, Q. & YAO, S. L. 2017. Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells. *Int J Mol Med*, 40, 31-38.
- MACE, E. M., HSU, A. P., MONACO-SHAWVER, L., MAKEDONAS, G., ROSEN, J. B., DROPULIC, L., COHEN, J. I., FRENKEL, E. P., BAGWELL, J. C., SULLIVAN, J. L., BIRON, C. A., SPALDING, C., ZERBE, C. S., UZEL, G., HOLLAND, S. M. & ORANGE, J. S. 2013. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. *Blood*, 121, 2669-77.

- MALE, V., NISOLI, I., KOSTRZEWSKI, T., ALLAN, D. S. J., CARLYLE, J. R., LORD, G. M., WACK, A. & BRADY, H. J. M. 2014. The transcription factor E4bp4/Nfil3 controls commitment to the NK lineage and directly regulates Eomes and Id2 expression. *Journal of Experimental Medicine*, 211, 635-642.
- MANITZ, M.-P., HORST, B., SEELIGER, S., STREY, A., SKRYABIN, B. V., GUNZER, M., FRINGS, W., SCHÖNLAU, F., ROTH, J., SORG, C. & NACKEN, W. 2003a. Loss of S100A9 (MRP14) Results in Reduced Interleukin-8-Induced CD11b Surface Expression, a Polarized Microfilament System, and Diminished Responsiveness to Chemoattractants In Vitro. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 1034-1043.
- MANITZ, M. P., HORST, B., SEELIGER, S., STREY, A., SKRYABIN, B. V., GUNZER, M., FRINGS, W., SCHÖNLAU, F., ROTH, J., SORG, C. & NACKEN, W. 2003b. Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. *Mol Cell Biol*, 23, 1034-43.
- MARASKOVSKY, E., CHEN, W. F. & SHORTMAN, K. 1989. IL-2 and IFN-gamma are two necessary lymphokines in the development of cytolytic T cells. *J Immunol*, 143, 1210-4.
- MCKNIGHT, A. J., MACFARLANE, A. J., DRI, P., TURLEY, L., WILLIS, A. C. & GORDON, S. 1996. Molecular cloning of F4/80, a murine macrophage-restricted cell surface glycoprotein with homology to the G-protein-linked transmembrane 7 hormone receptor family. *J Biol Chem*, 271, 486-9.
- MEINHARDT, K., KROEGER, I., BAUER, R., GANSS, F., OVSIY, I., ROTHAMER, J., BÜTTNER, M., ATREYA, I., WALDNER, M., BITTRICH, M., LEHMANN, C. H., RIEGER, M. A., BEILHACK, A., ZEISER, R., EDINGER, M., DUDZIAK, D., MACKENSEN, A., REHLI, M. & ULLRICH, E. 2015. Identification and characterization of the specific murine NK cell subset supporting graft-versus-leukemia- and reducing graft-versus-host-effects. *Oncoimmunology*, 4, e981483.
- MELVE, G. K., ERSVAER, E., EIDE, G. E., KRISTOFFERSEN, E. K. & BRUSERUD, Ø. 2018. Peripheral Blood Stem Cell Mobilization in Healthy Donors by Granulocyte Colony-Stimulating Factor Causes Preferential Mobilization of Lymphocyte Subsets. *Front Immunol*, 9, 845.
- MINCULESCU, L., SENGELOV, H., MARQUART, H. V., RYDER, L. P., FISCHER-NIELSEN, A. & HAASTRUP, E. 2021. Granulocyte Colony-Stimulating Factor Effectively Mobilizes TCR $\gamma\delta$ and NK Cells Providing an Allograft Potentially Enhanced for the Graft-Versus-Leukemia Effect for Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Front Immunol*, 12, 625165.
- MOORE, B. W. & MCGREGOR, D. 1965. CHROMATOGRAPHIC AND ELECTROPHORETIC FRACTIONATION OF SOLUBLE PROTEINS OF BRAIN AND LIVER. *J Biol Chem*, 240, 1647-53.
- MOROSO, V., FAMILI, F., PAPAIZIAN, N., CUPEDO, T., VAN DER LAAN, L. J., KAZEMIER, G., METSELAAR, H. J. & KWEKKEBOOM, J. 2011. NK cells can generate from precursors in the adult human liver. *Eur J Immunol*, 41, 3340-50.

- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.
- MURPHY, W. J., BENNETT, M., KUMAR, V. & LONGO, D. L. 1992. Donor-type activated natural killer cells promote marrow engraftment and B cell development during allogeneic bone marrow transplantation. *J Immunol*, 148, 2953-60.
- NAGAREDDY, P. R., MURPHY, A. J., STIRZAKER, R. A., HU, Y., YU, S., MILLER, R. G., RAMKHELAWON, B., DISTEL, E., WESTERTERP, M., HUANG, L. S., SCHMIDT, A. M., ORCHARD, T. J., FISHER, E. A., TALL, A. R. & GOLDBERG, I. J. 2013. Hyperglycemia promotes myelopoiesis and impairs the resolution of atherosclerosis. *Cell Metab*, 17, 695-708.
- NARUMI, K., MIYAKAWA, R., UEDA, R., HASHIMOTO, H., YAMAMOTO, Y., YOSHIDA, T. & AOKI, K. 2015. Proinflammatory Proteins S100A8/S100A9 Activate NK Cells via Interaction with RAGE. *J Immunol*, 194, 5539-48.
- NATHAN, C. F., MURRAY, H. W., WIEBE, M. E. & RUBIN, B. Y. 1983. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med*, 158, 670-89.
- NEWELL-PRICE, J., CLARK, A. J. & KING, P. 2000. DNA methylation and silencing of gene expression. *Trends Endocrinol Metab*, 11, 142-8.
- NIEDERWIESER, D., GASTL, G., RUMPOLD, H., MARTH, C., KRAFT, D. & HUBER, C. 1987. Rapid reappearance of large granular lymphocytes (LGL) with concomitant reconstitution of natural killer (NK) activity after human bone marrow transplantation (BMT). *British Journal of Haematology*, 65, 301-305.
- NIEMEYER, C. M., FLOTHO, C., LIPKA, D. B., STARÝ, J., RÖSSIG, C., BARUCHEL, A., KLINGEBIEL, T., MICALIZZI, C., MICHEL, G., NYSOM, K., RIVES, S., SCHMUGGE LINER, M., ZECCA, M., SCHÖNUNG, M., BAUMANN, I., NÖLLKE, P., BENETTAIB, B., BISERNA, N., POON, J., SIMCOCK, M., PATTURAJAN, M., MENEZES, D., GAUDY, A., VAN DEN HEUVEL-EIBRINK, M. M. & LOCATELLI, F. 2021. Response to upfront azacitidine in juvenile myelomonocytic leukemia in the AZA-JMML-001 trial. *Blood Advances*, 5, 2901-2908.
- NIKI, I., YOKOKURA, H., SUDO, T., KATO, M. & HIDAKA, H. 1996. Ca²⁺ signaling and intracellular Ca²⁺ binding proteins. *J Biochem*, 120, 685-98.
- NUKUI, T., EHAMA, R., SAKAGUCHI, M., SONEGAWA, H., KATAGIRI, C., HIBINO, T. & HUH, N. H. 2008. S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes. *J Cell Biochem*, 104, 453-64.
- ODINK, K., CERLETTI, N., BRÜGGEN, J., CLERC, R. G., TARCSAY, L., ZWADLO, G., GERHARDS, G., SCHLEGEL, R. & SORG, C. 1987. Two calcium-binding proteins in infiltrate macrophages of rheumatoid arthritis. *Nature*, 330, 80-2.
- OELKRUG, C., HILGER, N., SCHONFELDER, U., BOLTZE, J., SACK, U., FRICKE, C., HILDEBRANDT, G., KELLER, T., EMMRICH, F. & FRICKE,

- S. 2014. Modelling hematological parameters after total body irradiation. *Int J Radiat Biol*, 90, 538-46.
- OGAWA, M., MATSUZAKI, Y., NISHIKAWA, S., HAYASHI, S., KUNISADA, T., SUDO, T., KINA, T., NAKAUCHI, H. & NISHIKAWA, S. 1991. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med*, 174, 63-71.
- OLSON, J. A., LEVESON-GOWER, D. B., GILL, S., BAKER, J., BEILHACK, A. & NEGRIN, R. S. 2010. NK cells mediate reduction of GVHD by inhibiting activated, alloreactive T cells while retaining GVT effects. *Blood*, 115, 4293-301.
- OSSEVOORT, M. A., SIJTS, A. J., VAN VEEN, K. J., MOMBURG, F., HAMMERLING, G. J., SEELIG, A., BUTCHER, G. W., HOWARD, J. C., KAST, W. M. & MELIEF, C. J. 1993. Differential effect of transporter Tap 2 gene introduction into RMA-S cells on viral antigen processing. *Eur J Immunol*, 23, 3082-8.
- PARISH, C. R. 1999. Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol Cell Biol*, 77, 499-508.
- PENG, H., SUN, R., TANG, L., WEI, H. & TIAN, Z. 2013. CD62L is critical for maturation and accumulation of murine hepatic NK cells in response to viral infection. *J Immunol*, 190, 4255-62.
- PERUSSIA, B., CHEN, Y. & LOZA, M. J. 2005. Peripheral NK cell phenotypes: multiple changing of faces of an adapting, developing cell. *Molecular Immunology*, 42, 385-395.
- PITTARI, G., FREGNI, G., ROGUET, L., GARCIA, A., VATAIRE, A. L., WITTNEBEL, S., AMSELLEM, S., CHOUAIB, S., BOURHIS, J. H. & CAIGNARD, A. 2010. Early evaluation of natural killer activity in post-transplant acute myeloid leukemia patients. *Bone Marrow Transplantation*, 45, 862-871.
- RAMIREZ, K., CHANDLER, K. J., SPAULDING, C., ZANDI, S., SIGVARDSSON, M., GRAVES, B. J. & KEE, B. L. 2012. Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity*, 36, 921-32.
- RAMMES, A., ROTH, J., GOEBELER, M., KLEMP, M., HARTMANN, M. & SORG, C. 1997. Myeloid-related protein (MRP) 8 and MRP14, calcium-binding proteins of the S100 family, are secreted by activated monocytes via a novel, tubulin-dependent pathway. *J Biol Chem*, 272, 9496-502.
- RAULET, D. H., HELD, W., CORREA, I., DORFMAN, J. R., WU, M. F. & CORRAL, L. 1997. Specificity, tolerance and developmental regulation of natural killer cells defined by expression of class I-specific Ly49 receptors. *Immunol Rev*, 155, 41-52.
- RENOUX, VIRGINIE M., ZRIWIL, A., PEITZSCH, C., MICHAËLSSON, J., FRIBERG, D., SONEJI, S. & SITNICKA, E. 2015. Identification of a Human Natural Killer Cell Lineage-Restricted Progenitor in Fetal and Adult Tissues. *Immunity*, 43, 394-407.
- ROBBINS, S. H., TESSMER, M. S., MIKAYAMA, T. & BROSSAY, L. 2004. Expansion and Contraction of the NK Cell Compartment in Response to Murine Cytomegalovirus Infection. *The Journal of Immunology*, 173, 259-266.

- ROGERS, S. L., ROUHI, A., TAKEI, F. & MAGER, D. L. 2006. A role for DNA hypomethylation and histone acetylation in maintaining allele-specific expression of mouse NKG2A in developing and mature NK cells. *J Immunol*, 177, 414-21.
- ROSA, F. M. & FELLOUS, M. 1988. Regulation of HLA-DR gene by IFN-gamma. Transcriptional and post-transcriptional control. *The Journal of Immunology*, 140, 1660-1664.
- ROSENBAUER, F. & TENEN, D. G. 2007. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*, 7, 105-17.
- ROSMARAKI, E. E., DOUAGI, I., ROTH, C., COLUCCI, F., CUMANO, A. & DI SANTO, J. P. 2001. Identification of committed NK cell progenitors in adult murine bone marrow. *Eur J Immunol*, 31, 1900-9.
- RUGGERI, L., CAPANNI, M., URBANI, E., PERRUCCIO, K., SHLOMCHIK, W. D., TOSTI, A., POSATI, S., ROGAIA, D., FRASSONI, F., AVERSA, F., MARTELLI, M. F. & VELARDI, A. 2002. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 295, 2097-100.
- SANTI, D. V., NORMENT, A. & GARRETT, C. E. 1984. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81, 6993-7.
- SANTOURLIDIS, S., TROMPETER, H. I., WEINHOLD, S., EISERMANN, B., MEYER, K. L., WERNET, P. & UHRBERG, M. 2002. Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed killer cell Ig-like receptor expression patterns in NK cells. *J Immunol*, 169, 4253-61.
- SCHMIEDEL, B. J., ARÉLIN, V., GRUENEBACH, F., KRUSCH, M., SCHMIDT, S. M. & SALIH, H. R. 2011. Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int J Cancer*, 128, 2911-22.
- SERBINA, N. V., JIA, T., HOHL, T. M. & PAMER, E. G. 2008. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol*, 26, 421-52.
- SHLOMCHIK, W. D., COUZENS, M. S., TANG, C. B., MCNIFF, J., ROBERT, M. E., LIU, J., SHLOMCHIK, M. J. & EMERSON, S. G. 1999. Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science*, 285, 412-5.
- SILVERMAN, L. R., DEMAKOS, E. P., PETERSON, B. L., KORNBLITH, A. B., HOLLAND, J. C., ODCIMAR-REISSIG, R., STONE, R. M., NELSON, D., POWELL, B. L., DECASTRO, C. M., ELLERTON, J., LARSON, R. A., SCHIFFER, C. A. & HOLLAND, J. F. 2002. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*, 20, 2429-40.
- SIMONETTA, F., PRADIER, A. & ROOSNEK, E. 2016. T-bet and Eomesodermin in NK Cell Development, Maturation, and Function. *Front Immunol*, 7, 241.
- SMYTH, M. J., CRETNEY, E., KELLY, J. M., WESTWOOD, J. A., STREET, S. E., YAGITA, H., TAKEDA, K., VAN DOMMELEN, S. L., DEGLI-

- ESPOSTI, M. A. & HAYAKAWA, Y. 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol*, 42, 501-10.
- SOHLBERG, E., PFEFFERLE, A., ANDERSSON, S., BAUMANN, B. C., HELLSTRÖM-LINDBERG, E. & MALMBERG, K. J. 2015. Imprint of 5-azacytidine on the natural killer cell repertoire during systemic treatment for high-risk myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*, 6, 34178-90.
- SOHNLE, P. G., COLLINS-LECH, C. & WIESSNER, J. H. 1991. Antimicrobial activity of an abundant calcium-binding protein in the cytoplasm of human neutrophils. *J Infect Dis*, 163, 187-92.
- SORM, F., PÍSKALA, A., CIHÁK, A. & VESELÝ, J. 1964. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*, 20, 202-3.
- SPANHOLTZ, J., TORDOIR, M., EISSENS, D., PREIJERS, F., VAN DER MEER, A., JOOSTEN, I., SCHAAP, N., DE WITTE, T. M. & DOLSTRA, H. 2010. High log-scale expansion of functional human natural killer cells from umbilical cord blood CD34-positive cells for adoptive cancer immunotherapy. *PLoS One*, 5, e9221.
- SPITS, H., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J. P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. J., MEBIUS, R. E., POWRIE, F. & VIVIER, E. 2013. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nature Reviews Immunology*, 13, 145-149.
- SREEJIT, G., ABDEL-LATIF, A., ATHMANATHAN, B., ANNABATHULA, R., DHYANI, A., NOOTHI, S. K., QUAIFE-RYAN, G. A., AL-SHAREA, A., PERNES, G., DRAGOLJEVIC, D., LAL, H., SCHRODER, K., HANAOKA, B. Y., RAMAN, C., GRANT, M. B., HUDSON, J. E., SMYTH, S. S., PORRELLO, E. R., MURPHY, A. J. & NAGAREDDY, P. R. 2020. Neutrophil-Derived S100A8/A9 Amplify Granulopoiesis After Myocardial Infarction. *Circulation*, 141, 1080-1094.
- STEINBAKK, M., NAESS-ANDRESEN, C. F., LINGAAS, E., DALE, I., BRANDTZAEG, P. & FAGERHOL, M. K. 1990. Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*, 336, 763-5.
- STRESEMANN, C. & LYKO, F. 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer*, 123, 8-13.
- STYCZYŃSKI, J., TRIDELLO, G., KOSTER, L., IACOBELLI, S., VAN BIEZEN, A., VAN DER WERF, S., MIKULSKA, M., GIL, L., CORDONNIER, C., LJUNGMAN, P., AVERBUCH, D., CESARO, S., DE LA CAMARA, R., BALDOMERO, H., BADER, P., BASAK, G., BONINI, C., DUARTE, R., DUFOUR, C., KUBALL, J., LANKESTER, A., MONTOTO, S., NAGLER, A., SNOWDEN, J. A., KRÖGER, N., MOHTY, M., GRATWOHL, A. & FOR THE INFECTIOUS DISEASES WORKING PARTY, E. 2020. Death after hematopoietic stem cell transplantation: changes over calendar year time, infections and associated factors. *Bone Marrow Transplantation*, 55, 126-136.
- SUNDERKÖTTER, C., NIKOLIC, T., DILLON, M. J., VAN ROOIJEN, N., STEHLING, M., DREVETS, D. A. & LEENEN, P. J. 2004. Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response. *J Immunol*, 172, 4410-7.

- TELFORD, W. G., BABIN, S. A., KHOREV, S. V. & ROWE, S. H. 2009. Green Fiber Lasers: An Alternative to Traditional DPSS Green Lasers for Flow Cytometry. *Cytometry Part A*, 75a, 1031-1039.
- TERRY, R. L. & MILLER, S. D. 2014. Molecular control of monocyte development. *Cell Immunol*, 291, 16-21.
- TRINCHIERI, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv Immunol*, 47, 187-376.
- TRUITT, R. L. & ATASOYLU, A. A. 1991. Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, 8, 51-8.
- TU, T. C., BROWN, N. K., KIM, T. J., WROBLEWSKA, J., YANG, X., GUO, X., LEE, S. H., KUMAR, V., LEE, K. M. & FU, Y. X. 2015. CD160 is essential for NK-mediated IFN- γ production. *J Exp Med*, 212, 415-29.
- TULP, A. & BONT, W. S. 1975. An improved method for the separation of cells by sedimentation at unit gravity. *Anal Biochem*, 67, 11-21.
- UCHIDA, T., KINOSHITA, T., NAGAI, H., NAKAHARA, Y., SAITO, H., HOTTA, T. & MURATE, T. 1997. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 90, 1403-9.
- VACCA, P., VITALE, C., MONTALDO, E., CONTE, R., CANTONI, C., FULCHERI, E., DARRETTA, V., MORETTA, L. & MINGARI, M. C. 2011. CD34+ hematopoietic precursors are present in human decidua and differentiate into natural killer cells upon interaction with stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 2402-2407.
- VESELÝ, J. & ČIHÁK, A. 1978. 5-Azacytidine: Mechanism of action and biological effects in mammalian cells. *Pharmacology & Therapeutics. Part A: Chemotherapy, Toxicology and Metabolic Inhibitors*, 2, 813-840.
- VITALE, M., FALCO, M., CASTRICONI, R., PAROLINI, S., ZAMBELLO, R., SEMENZATO, G., BIASSONI, R., BOTTINO, C., MORETTA, L. & MORETTA, A. 2001. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *European Journal of Immunology*, 31, 233-242.
- VIVIER, E., ARTIS, D., COLONNA, M., DIEFENBACH, A., DI SANTO, J. P., EBERL, G., KOYASU, S., LOCKSLEY, R. M., MCKENZIE, A. N. J., MEBIUS, R. E., POWRIE, F. & SPITS, H. 2018. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, 174, 1054-1066.
- VIVIER, E., TOMASELLO, E., BARATIN, M., WALZER, T. & UGOLINI, S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*, 9, 503-10.
- VOGL, T., TENBROCK, K., LUDWIG, S., LEUKERT, N., EHRHARDT, C., VAN ZOELLEN, M. A., NACKEN, W., FOELL, D., VAN DER POLL, T., SORG, C. & ROTH, J. 2007. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med*, 13, 1042-9.
- WALZER, T., BLERY, M., CHAIX, J., FUSERI, N., CHASSON, L., ROBBINS, S. H., JAEGER, S., ANDRE, P., GAUTHIER, L., DANIEL, L., CHEMIN, K., MOREL, Y., DALOD, M., IMBERT, J., PIERRES, M., MORETTA, A., ROMAGNE, F. & VIVIER, E. 2007. Identification, activation, and

- selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3384-9.
- WEISCHENFELDT, J. & PORSE, B. 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*, 2008, pdb prot5080.
- WELTE, S., KUTTRUFF, S., WALDHAUER, I. & STEINLE, A. 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol*, 7, 1334-42.
- WOITERSKI, J., EBINGER, M., WITTE, K., GOECKE, B., HEININGER, V., PHILIPPEK, M., BONIN, M., SCHRAUDER, A., RÖTTGERS, S., HERR, W., LANG, P., HANDGRETINGER, R., HARTWIG, U. & ANDRÉ, M. 2013. Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2Rcnull mice reflects individual leukemogenecity and highly correlates with clinical outcome. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 133.
- WU, J. & LANIER, L. L. 2003. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res*, 90, 127-56.
- YOKOTA, Y., MANSOURI, A., MORI, S., SUGAWARA, S., ADACHI, S., NISHIKAWA, S.-I. & GRUSS, P. 1999. Development of peripheral lymphoid organs and natural killer cells depends on the helix-loop-helix inhibitor Id2. *Nature*, 397, 702-706.
- YU, J., FREUD, A. G. & CALIGIURI, M. A. 2013. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol*, 34, 573-82.
- YU, J., PARASURAMAN, S., SHAH, A. & WEISDORF, D. 2019. Mortality, length of stay and costs associated with acute graft-versus-host disease during hospitalization for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Current Medical Research and Opinion*, 35, 983-988.
- ZAFIROVA, B., MANDARIĆ, S., ANTULOV, R., KRMPOTIĆ, A., JONSSON, H., YOKOYAMA, W. M., JONJIĆ, S. & POLIĆ, B. 2009. Altered NK Cell Development and Enhanced NK Cell-Mediated Resistance to Mouse Cytomegalovirus in NKG2D-Deficient Mice. *Immunity*, 31, 270-282.
- ZEISER, R. & BLAZAR, B. R. 2017. Acute Graft-versus-Host Disease - Biologic Process, Prevention, and Therapy. *N Engl J Med*, 377, 2167-2179.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Abteilung I, Hämatologie und Onkologie der Universitätskinderklinik Tübingen unter der Betreuung von PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya C. André angefertigt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch PD Dr. med. Dr. rer. nat. Maya C. André. Sämtliche Experimente wurden von mir, nach Einarbeitung durch cand. med. Franziska Ginsberg und MTA Sarah Bühler, eigenständig und unterstützt durch MTA Sarah Bühler, durchgeführt. Ausnahmen hiervon waren lediglich die Messungen der S100A8/A9 Werte, welche nach Probengewinnung durch mich, von den Mitarbeitern von Prof. T. Vogl, Institut für Immunologie des Universitätsklinikums Münster, durchgeführt wurde.

Nach Absolvierung des Tierschutzkurses und Einarbeitung durch den PhD Studenten Malte Ritter wurden alle Tierversuche, einschließlich der Bestrahlung, des täglichen Wiegens und Erhebens des Gesundheitszustandes, der i.p. Injektionen, der Euthanasie und der postmortalen Probengewinnung eigenständig in Anwesenheit eines verantwortlichen Mitarbeiters durchgeführt.

Alle durchflusszytometrischen Messungen und Auswertungen erfolgten nach Einarbeitung durch Sarah Bühler durch mich. Gating und statistische Auswertung erfolgten nach Beratung durch das Institut für Biometrie selbständig.

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

Tübingen, den 07.03.2024

gez. Ben Felix Brösamle

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. Maya André für ihre herausragende Unterstützung während meiner Doktorarbeit bedanken. Trotz der räumlichen Distanz standest Du mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite und Deine exzellente Betreuung hat wesentlich zu den Fortschritten dieser Arbeit beigetragen. Ich konnte nicht nur fachlich, sondern auch menschlich viel aus dieser Zeit für meinen späteren Lebensweg mitnehmen.

Ein besonderer Dank geht auch an die leitende MTA Sarah Bühler, deren langjährige Laborerfahrung und kreative Ideen in den entscheidenden Momenten eine unschätzbare Hilfe waren.

Die Förderung durch das Interdisziplinäre Promotionskolleg der Universität Tübingen hat nicht nur finanzielle, sondern auch inhaltliche Unterstützung geboten, was meiner Arbeit eine wertvolle Struktur verliehen hat.

Meinen Eltern gebührt mein Dank für ihre moralische und finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, mich parallel zu meinem Studium vollkommen auf diese Arbeit zu konzentrieren.

Danke auch an Squishy, die sich regelmäßig nach meinen Mäusen erkundigt hat und während dieser Zeit immer an meiner Seite war.

Ben Felix Brösamle