

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinikum der Universität München

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

Migrationsverhalten von NK-Zellen nach Stimulation mit dem TLR7-Agonisten Resiquimod



Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Angelina Krächan

aus Lebach

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister
apl. Prof. Dr. med. Andreas Eigler

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Gabriela Wiedemann
Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.01.2022

Meinen Eltern
und meinem Opa Peter

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Modalitäten der Tumorthherapie.....	1
1.2 Das Immunsystem	2
1.2.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem	2
1.2.2 Natürliche Killerzellen	3
1.2.3 Dendritische Zellen	5
1.2.4 Die <i>Toll-like</i> -Rezeptor Familie.....	5
1.3 TLR7-Agonisten und ihre Anwendung.....	7
1.3.1 Wirkungsweise der TLR7-Agonisten	7
1.3.2 Der TLR7-Agonist Imiquimod und seine klinische Anwendung	8
1.3.3 Der TLR7-Agonist Resiquimod (R848) als Weiterentwicklung	8
1.4 Fragestellung	9
2. Material	10
2.1. Reagenzien und Chemikalien.....	10
2.2 Puffer und Medien	11
2.3 Kommerzielle Reagenziensets	11
2.4 FACS Antikörper	12
2.5 Geräte.....	13
2.6 Software.....	14
3. Methoden	15
3.1 Tierversuche	15
3.1.1 Mäuse	15
3.1.2 <i>In vivo</i> Stimulation mit dem TLR7-Agonist R848	15
3.1.3 <i>In vivo</i> Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern	15
3.1.4 Adoptiver NK-Zelltransfer	16
3.2 Zelluläre Methoden	16
3.2.1 Gewinnung von Splenozyten	16
3.2.2 Gewinnung von intrahepatischen Immunzellen	16
3.2.3 Herstellung von Organlysaten	17
3.2.4 Migration Assay	17
3.3 Immunologische Methoden.....	18
3.3.1 Isolierung einer Zellpopulation mittels magnetischer Zellseparation	18
3.3.2 Durchflusszytometrie	19
3.4 Molekularbiologische Methoden	19
3.4.1 RNA Isolation mit Trizol	19

3.4.2 Reverse Transkription.....	20
3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion	20
3.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR	20
3.5 Statistische Analysen.....	21
4. Ergebnisse	22
4.1 TLR7-Agonist R848 induziert NK-Zell-Migration in die Leber	22
4.1.1 Aktivierte, reife NK-Zellen migrieren durch Stimulation mit R848 aus der Milz in die Leber.....	22
4.1.2 CD3-positive T-Zellen zeigen keine Migration in die Leber nach Behandlung mit R848	23
4.1.3 In die Leber migrierte NK-Zellen zeigen eine verstärkte Expression von CCR5 .	24
4.2 Chemerin als potentes chemotaktisch auf NK-Zellen wirksames Zytokin.....	27
4.2.1 Erhöhte CXCL9- und Chemerin-Spiegel in der Leber R848-behandelter Mäuse	27
4.2.2 Hochregulation des Chemerin-bindenden CMKLR1 Rezeptors auf stimulierten NK-Zellen.....	28
4.2.3 NK-Zellen migrieren <i>in vitro</i> dosisabhängig auf rekombinantes Chemerin	30
4.2.4 Der Migrationseffekt kann durch Chemerin- <i>in-vivo</i> -Depletion aufgehoben werden	31
5. Diskussion.....	33
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	33
5.2 R848 ist ein wirksamer Ligand zur systemischen Aktivierung von NK-Zellen.....	35
5.3 R848-aktivierte NK-Zellen wandern gezielt aus der Milz in die Leber.....	36
5.4 Chemokin-Induktion in der Leber nach systemischer R848-Anwendung	37
5.4.1 Systemische R848-Anwendung führt zu einer Chemerin-Induktion in der Leber	37
5.4.2 Induktion weiterer Chemokine in der Leber nicht wegweisend	38
5.5 Gezielte Migration R848-aktiverter NK-Zellen auf Chemerin	39
5.6 Ausblick	40
6. Zusammenfassung	41
7. Literaturverzeichnis.....	43
8. Verzeichnis der Abkürzungen	55
9. Danksagung	57
10. Veröffentlichungen	58
11. Lebenslauf.....	59
Eidesstattliche Versicherung	61

1. Einleitung

1.1 Modalitäten der Tumorthherapie

Pro Jahr erkranken etwa eine halbe Million Menschen in Deutschland an Krebs (Robert Koch Institut 2020). Es wird angenommen, dass die Inzidenzrate in den kommenden Jahren weiter ansteigen wird. Die Tumorforschung ist daher nach wie vor eines der größten Forschungsgebiete weltweit. In den letzten Jahren hat sich die Therapie von Tumorerkrankungen zunehmend in Richtung neuer Behandlungsansätze entwickelt. Zu den klassischen drei Säulen der Tumorthherapie Chemotherapie, chirurgische Resektion und Bestrahlung, die gerade im metastasierten Stadium häufig nur kurzzeitig helfen, sollen neue Strategien hinzukommen. Besonders die Chemotherapie weist nur eine geringe therapeutische Breite auf und muss ständig an die Eigenschaften der Erkrankung und die Konstitution des Patienten adjustiert werden. Durch die Methoden der klassischen Therapie werden häufig nicht nur kranke Zellen, sondern auch viele umliegende, gesunde Zellen in Mitleidenschaft gezogen und führen zu erheblichen und oft auch Therapie-limitierenden Nebenwirkungen.

Die immunologische Tumorthherapie hat in den letzten Jahren die Behandlung einiger maligner Erkrankungen revolutioniert. Ziel der Immuntherapie ist die gezielte Erkennung und Abtötung von Tumorzellen durch die körpereigene Abwehr. Die Modifizierung von körpereigenen Abwehrzellen erlaubt zudem eine präzisere Tumolyse ohne dabei gesunde Zellen zu eradizieren. Mit der Immuntherapie von Krebserkrankungen hat sich ein neues und vielseitiges Feld an Behandlungsmöglichkeiten eröffnet (Lim et al. 2017). Seit der erstmaligen Zulassung einer adoptiven CAR-T-Zell-Therapie durch die *Food and Drug Administration (FDA)* im Oktober 2017 und der klinischen Anwendung von Checkpoint-Inhibitoren wie PD-1- und CTLA-4-Blockern (seit 2011) wurde somit die klassische Therapie um eine neue, vielversprechende Behandlungsmöglichkeit erweitert (Rose 2017). Nicht nur Zellen der erworbenen Immunität, sondern auch Zellen der angeborenen Abwehr werden als Möglichkeit zur gezielten Tumorerkennung untersucht, so unter anderem natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Davis et al. 2015). NK-Zellen sind lymphoide Zellen des angeborenen Immunsystems, welche sich durch die Fähigkeit auszeichnen, infizierte und maligne Zellen rasch zu erkennen und zu eliminieren. Besonders nach der Erkenntnis, dass auch NK-Zellen langlebige, antigenspezifische Gedächtniszellen ausbilden können (Sun et al. 2009, Cerwenka et al. 2016), rückten sie in den Vordergrund für immunologische Therapieansätze (Hu et al. 2018, Zhang et al. 2020).

Eine weitere Säule in der Immuntherapie von Krebs sind die so genannten Immunmodulatoren wie z.B. synthetisch hergestellte Interferone, Interleukine oder *small molecules*. Eine Anwendung findet z.B. bei aktinischen Keratosen statt. Berücksichtigt man die Auswirkungen der Immunmodulatoren auf Immunzellen und damit gegebenenfalls auch auf gentechnisch veränderte Zellen, könnten zukünftig Kombinationstherapien aus Immunmodulatoren und spezifischen Immunzelltherapien zu vielversprechenden neuen Tumorthapieansätzen genutzt werden.

1.2 Das Immunsystem

1.2.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Vereinfacht dargestellt lässt sich die menschliche Immunreaktion in zwei Säulen unterteilen: die angeborene und die erworbene Immunität. Zum angeborenen Immunsystem gehören diejenigen Zellen, die eine schnelle und unspezifische Antwort auf z.B. pathogene Keime gewährleisten (Ezekowitz et al. 1996, Riera Romo et al. 2016). Dazu zählen u.a. dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC), Makrophagen und NK-Zellen (Kiessling et al. 1975, Artis et al. 2015). Durch im Blut zirkulierende und im Gewebe ansässige DC und Makrophagen werden Proteinbestandteile der Erreger erkannt und führen zu einer Aufnahme der Keime in das Zellinnere (Rosales et al. 2017). Dort werden die Erreger prozessiert und bestimmte Proteine, so genannte Antigene, auf der Zelloberfläche präsentiert (Kotsias et al. 2019). Diese so genannten Antigen-präsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APC) leiten somit die weitere Immunantwort ein und bilden eine Schnittstelle zum adaptiven Immunsystem (Knight et al. 1993, Iwasaki et al. 2015).

Das adaptive Immunsystem besteht grob unterteilt aus den T- und den B-Lymphozyten. Im Gegensatz zu den Zellen der angeborenen Immunität benötigen T- und B-Zellen eine gezielte Aktivierung. So werden beispielsweise mehrere T-Zellen unterschiedlicher Antigenspezifität in die Nähe einer APC-Zelle gelockt. Nur die T-Zelle, deren Oberflächenepitop das präsentierte Antigen binden kann, wird aktiviert. Das Prinzip der gezielten Bindung wird auch Schlüssel-Schloss-Prinzip genannt (Smith-Garvin et al. 2009). Die Antigen-präsentierenden Zellen sowie alle körpereigenen Zellen nutzen die Oberflächenproteine *Major Histocompatibility Complex* (MHC) I (für zelleigene Antigene) und MHC II (für in APC prozessierte Antigene) zur extrazellulären Antigenpräsentation (Romani et al. 1989, Puré et al. 1990). Von den T-Zellen wird ein Komplex aus CD3 und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) exprimiert. Dieser bindet mit Hilfe zusätzlicher Rezeptoren das präsentierte Antigen

und führt zu einer intrazellulären Aktivierung der Signalkaskade (de Vries et al. 1989, Choudhuri et al. 2005). Dabei werden hauptsächlich zwei Arten unterschieden: die CD4⁺ T-Helferzellen und die CD8⁺ T-Killerzellen. CD8⁺ T-Zellen erkennen Antigene, die vom MHC-I-Komplex präsentiert werden und verfügen ähnlich den Zellen der angeborenen Immunität über die Fähigkeit z.B. Virus befallene Zellen oder entartete Zellen abzutöten (Brown et al. 1990). Im Gegensatz zur Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunität ist die Aktivierung von T-Zellen ein vergleichsweise komplexer Prozess. Zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen werden immer drei Faktoren benötigt: die Antigen-spezifische Bindung an den TCR, die Aktivierung kostimulatorischer Rezeptoren wie z.B. CD28 sowie proinflammatorische Zytokine (Chen et al. 2013). Zudem werden auch von diesen Zellen bei Aktivierung Zytokine freigesetzt, welche wiederum zu einer weiteren Rekrutierung spezifischer Abwehrzellen führen. Die CD4⁺ T-Zellen oder auch T-Helferzellen spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der adaptiven Immunantwort. Antigene, die über den MHC-II-Komplex präsentiert werden, werden von CD4⁺ T-Zellen erkannt und aktivieren diese. Dadurch können sie durch die Ausschüttung von Zytokinen diversen Immunzellen oder immunologischen Prozessen assistieren (Zajac et al. 1998, Li et al. 2004). So erfolgt z.B. über eine Freisetzung T-Zell-aktivierender Zytokine eine Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen (Zajac et al. 1998, Zander et al. 2019).

Eine weitaus schnellere und weniger komplexe Aktivierung findet bei den Zellen der angeborenen Immunität statt. Insbesondere NK-Zellen verfügen ähnlich wie CD8⁺ T-Zellen über ein hohes zytotoxisches Potenzial und können schnell, aber unspezifisch aktiviert werden.

1.2.2 Natürliche Killerzellen

Aus einer lymphoiden Vorläuferzelle entstehen drei Zellarten: T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und die angeborenen lymphoiden Zellen (ILC), zu welchen auch NK-Zellen zählen (Mazzurana et al. 2018). Durch ihre Antigen-spezifische Aktivierung zählen B- und T-Zellen zu den Hauptsäulen der adaptiven Immunantwort. Im Gegensatz dazu werden NK-Zellen unspezifisch aktiviert und daher traditionell dem angeborenen Immunsystem zugeordnet (Seillet et al. 2016), auch wenn in den letzten Jahren zunehmend adaptive Eigenschaften der NK-Zellen beschrieben wurden (Cruz-Muñoz et al. 2019). Bei den NK-Zellen handelt es sich um granulierten Zellen, die mit ihrer Zell-lyisierenden Funktion das Pendant zu den zytotoxischen T-Zellen der adaptiven Immunantwort bilden (Sun et al. 2011).

Es werden verschiedene Arten der NK-Zell-Aktivierung unterschieden (Long et al. 2013). In der frühen Phase der Infektion werden von DC und Makrophagen Zytokine gebildet, die nach Ausschüttung weitere Immunzellen zum Ort der Entzündung rekrutieren. Hierbei handelt es sich um Interferone (IFN), Interleukine (IL) oder Tumornekrose-Faktoren (TNF). Im Fall der NK-Zell-Aktivierung sind vor allem die Typ-I-Interferone IFN- α und IFN- β von großer Bedeutung (Anderson 1982). Außerdem spielen die Interleukine IL-12 und IL-18 eine bedeutende Rolle bei viralen Infektionen und einer frühzeitigen Zell-Aktivierung (Cooper et al. 2009, Song et al. 2018).

Ein wichtiges Oberflächenprotein, welches auf nahezu allen Zellen des Körpers vorhanden ist, ist MHC (Apanius et al. 1997, Agrawal et al. 2000). Wie bereits oben beschrieben spielt der MHC-Komplex eine essenzielle Rolle in der Antigenpräsentation und damit in der Aktivierung der adaptiven Immunantwort, insbesondere der T-Zellen (Brown et al. 1990, Janeway 2001). Über MHC können neben Pathogenen auch körpereigene Antigene präsentiert werden, die die gesunden Zellen durch inhibitorische Signale vor einer Lyse schützen. Hierfür besitzen NK-Zellen auf ihrer Oberfläche die *killer immunoglobulin like receptors* (KIR, im Menschen; bei der Maus Ly49A), welche MHC erkennen (Gardiner 2008, Walter et al. 2017). Im Falle eines herunterregulierten (z.B. bei Tumorzellen) oder nicht vorhandenen MHC-Proteins wird über eine fehlende Inhibition eine NK-Zell-Aktivierung und darauffolgende Zellyse ausgelöst (Hasenkamp et al. 2008). Die Zelle schüttet ihre Granula, gefüllt mit u.a. Perforin und Proteasen, auf die Zielzelle aus. Man nennt diesen vermuteten Mechanismus auch „*Missing-self*-Hypothese“ (Ljunggren et al. 1990, Babić et al. 2010).

Eine zusätzliche Möglichkeit der Zellyse geschieht über eine direkte Bindung der Antikörper auf der Oberfläche einer markierten Zelle. Diesen Vorgang bezeichnet man auch als Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (*antibody-dependent-cell-mediated-killing*, ADCC) und ist ein Mechanismus der humoralen Immunantwort (Zhang et al. 2018, Sun et al. 2019). Genauer werden die Oberflächen-Antigene der eingedrungenen Erreger mit einem passenden Antikörper gebunden, der z.B. von einer zuvor durchlaufenen Infektion mit dem gleichen Erreger stammen kann. Dieser Antigen-Antikörper-Komplex wird von NK-Zellen erkannt und führt zu einer sofortigen Ausschüttung der Zell-lysierenden Granula. Für die Rekrutierung von NK-Zellen sind vor allem Antikörper der Klasse IgG verantwortlich, während auf Seite der NK-Zellen Variationen des Fc γ III-Rezeptors vorhanden sein müssen (Koene et al. 1997, Sulica et al. 2001).

NK-Zellen, wie auch viele andere Immunzellen, benötigen zur Aktivierung und Abfolge einer geordneten Immunreaktion Signalproteine wie z.B. Interferon. Hier kommt den Zellen, welche den ersten Kontakt zu Pathogenen bilden, eine besondere Bedeutung zu. Eine Schlüsselfunktion besitzen in diesem Zusammenhang DC. Sie sind nicht nur Hauptproduzent von Typ I Interferonen, sondern verbinden auch angeborene und erworbene Immunantwort (Cella et al. 1999, Siegal et al. 1999).

1.2.3 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind eine heterogene Gruppe aus Zellen, die sich aus unterschiedlichen Vorläuferzellen entwickeln können (Collin et al. 2013). Sie gehören zu den effizientesten Antigen-präsentierenden Zellen und bilden dadurch eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem (Banchereau et al. 1998). Konventionelle dendritische Zellen wandern schnell aus den Gefäßen aus und sind überwiegend in der Haut und im extravasalen Gewebe zu finden. Sie stellen den „Erstkontakt“ zu eingedrungenen Erregern dar und führen zu einer Aktivierung des Immunsystems (Allan et al. 2003). Sie sind in der Lage, Erreger oder Erregerbestandteile aufzunehmen, zu prozessieren und anschließend auf der Oberfläche zu präsentieren. Im Hinblick auf diese Arbeit spielen DC eine wichtige Rolle in der indirekten Aktivierung von NK-Zellen über den TLR7-Agonisten (Romagnani et al. 2005). Aufgrund der fehlenden TLR7-Expression auf NK-Zellen, findet die Aktivierung mit dem Agonisten indirekt über dendritische Zellen statt. Dort führt die Bindung zu einer raschen Ausschüttung von IFN- α vorwiegend durch plasmazytoide DC (pDC) (Applequist et al. 2002, Kobold et al. 2014).

Als Zellen des Primärkontaktes besitzen DC zur Erkennung von pathogenen Mustern verschiedene Rezeptoren aus der Gruppe der *pattern recognition receptors (PRR)*. Eine Untergruppe der PRR stellen die *Toll-like-Rezeptoren* dar.

1.2.4 Die *Toll-like-Rezeptor* Familie

Die Familie der *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) spielt eine entscheidende Rolle in der Erkennung pathogener Keime und Viren. Insgesamt werden im Menschen zehn verschiedene *Toll-like-Rezeptoren* exprimiert, in der Maus sind derzeit dreizehn bekannt.

Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) fassen die Strukturen, die durch TLR erkannt werden, zusammen. Dazu

zählen Kohlenhydratketten, Lipide und Proteine, welche sich durch ihre spezifische repetitive Anordnung als körperfremder Bestandteil zu erkennen geben. PAMPs werden durch extra- oder intrazelluläre *Toll-like-Rezeptoren* erkannt (Rakoff-Nahoum et al. 2009). So wird z.B. das Lipopolysaccharid (LPS) als Bestandteil der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien durch TLR4 an der Zelloberfläche erkannt. Andere Toll-like-Rezeptoren befinden sich im Zellinneren und sind für die Erkennung viraler RNA oder DNA zuständig. Endosomal gelegen sind die Rezeptoren TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 (Abb 1). Durch Phagozytose oder Endozytose werden die Pathogene im Zellinneren den Rezeptoren präsentiert. Die eingedrungene Virus-RNA wird von TLR7 (einzelsträngige RNA, ssRNA) und TLR3 (doppelsträngige RNA, dsRNA) erkannt (Abb. 1)(Diebold et al. 2004). TLR9 erkennt bakterielle DNA-Sequenzen, die im Gegensatz zu menschlicher DNA viele unmethylierte CpG-Dinukleotide enthält (Abb. 1)(Uematsu et al. 2006).

Allen *Toll-like-Rezeptoren* gemeinsam ist die Liganden-induzierte Dimerisierung, die zu einer Aktivierung der transmembranen Signalkaskade führt. Je nach Rezeptor werden unterschiedliche Signalwege aktiviert. Am Ende der Signalketten wird ein Transkriptionsfaktor so modifiziert, dass er die Zellkernmembran passieren kann und zu einer Expressionssteigerung der Zytokin- und Interferon-Gene führt.

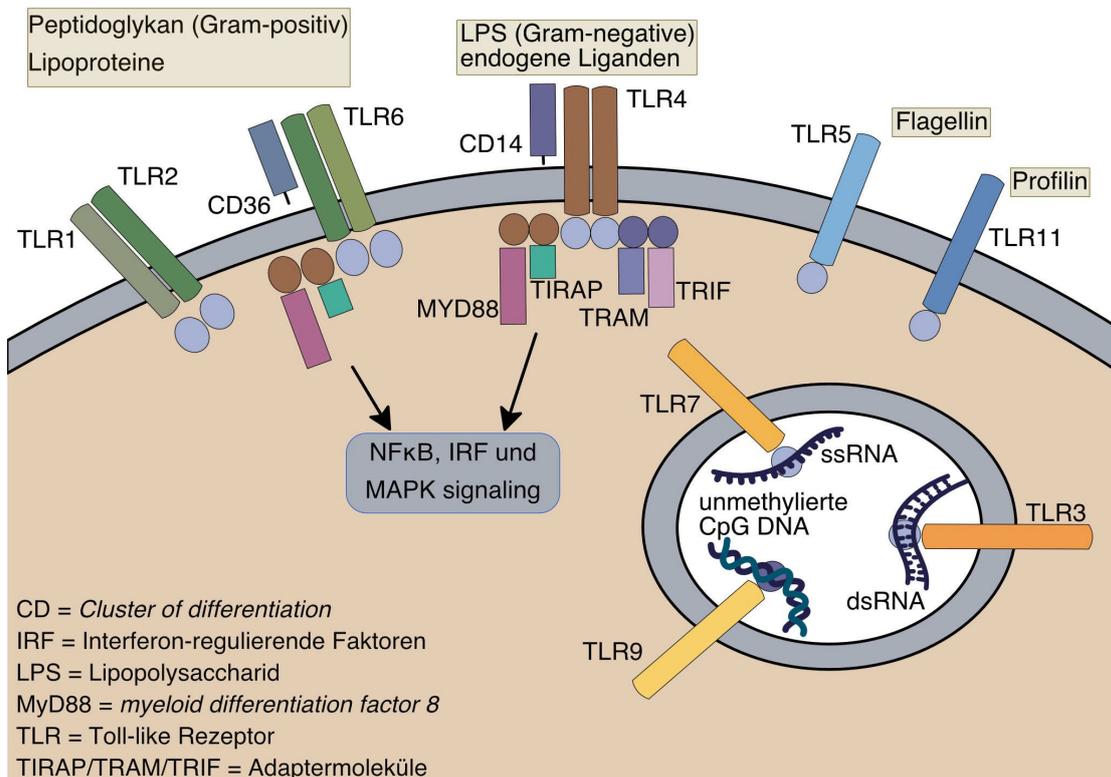


Abbildung 1: Familie der Toll-like-Rezeptoren mit Vorkommen in der Zelle und zugehörigen Liganden. Zu sehen ist die Verteilung der bisher bekannten Toll-like-Rezeptoren und die dazugehörigen Pathogenbestandteile, die von ihnen erkannt werden können. An der äußeren Zellmembran werden Proteine als direkte Elemente pathogener Keime von TLR gebunden und leiten nach intrazellulär die Aktivierung weiter. Genetische Bestandteile wie DNA, RNA oder Erbgut-Fragmente werden von intrazellulär lokalisierten Rezeptoren (TLR3, TLR7 und TLR9) erkannt. Als gemeinsame Endstrecke werden Transkriptionsfaktoren aktiviert und führen zu einer gesteigerten Transkription antiinflammatorischer Gene. Modifiziert nach Rakoff-Nahoum, S., Medzhitov, R. "Toll-like receptors and cancer." *Nat Rev Cancer* (2009)

Die TLR bilden somit eine interessante Schnittstelle zur therapeutischen Aktivierung der Immunzellen über intrinsische Signalkaskaden. Dabei fällt der Blick besonders auf die intrazellulär lokalisierten Rezeptoren. Membran-gebundene TLR besitzen ein weitläufiges Expressionsmuster, wodurch deren Aktivierung zu einem Überangebot an freigesetzten Zytokinen führen könnte (Engelhardt et al. 1991). Das wiederum erhöht die Wahrscheinlichkeit schwerwiegender Nebenwirkungen z.B. bei einer systemischen Anwendung. Im Gegensatz dazu ist das Verteilungsmuster endosomal lokalisierter TLR auf nur wenige Zellpopulationen restringiert (Hornung et al. 2005). In der systemischen Anwendung sind daher sowohl Wirkung als auch Nebenwirkung begrenzt. Trotzdem führte in vielen Untersuchungen die systemische Anwendung zu limitierenden Nebenwirkungen, bevor die effektive Wirkungs-dosis erreicht werden konnte (Witt et al. 1993, Dudek et al. 2007). Nur im Bereich der TLR7-Agonisten konnten Erfolge verzeichnet und eine erste Zulassung (bisher ausschließlich zur lokalen Anwendung) erreicht werden (Arits et al. 2013, Chitwood et al. 2013).

1.3 TLR7-Agonisten und ihre Anwendung

1.3.1 Wirkungsweise der TLR7-Agonisten

TLR7-Agonisten zählen strukturell zu den niedermolekularen Verbindungen (*small molecule*). Das *small molecule* wird nach Applikation, ähnlich wie ein Virus, von Zellen der angeborenen Immunantwort erkannt. Aufgrund der intrazellulären Expression von TLR7 muss die Struktur in einem ersten Schritt in das Zellinnere aufgenommen werden. Dies geschieht durch die so genannte Endozytose. Dabei werden Partikel, die sich in der Zellumgebung befinden, durch Ausstülpung und Abschnürung der Zellmembran in das Innere aufgenommen. Intrazellulär kann dann die ssRNA-ähnliche Struktur an den TLR7-Rezeptor binden. Durch die Bindung an den Rezeptor dimerisieren zwei ektopie Anteile und führen zu einer Aktivierung von MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*) intraendosomal. Der Interferon-regulierende Faktor 7 (IRF7) wird dadurch phosphoryliert. Das ermöglicht dem Transkriptionsfaktor den Eintritt in den Nukleus und führt dort zu einem vermehrten Ablesen der Sequenzen zur

Expression proinflammatorischer Zytokine wie z.B. antiviraler Interferone (IFN- α und IFN- β) (Hemmi et al. 2002, Hart et al. 2005).

1.3.2 Der TLR7-Agonist Imiquimod und seine klinische Anwendung

Imiquimod ist der erste zugelassene TLR7-Agonist für die klinische Anwendung. Durch die Eigenschaft, den TLR7-Rezeptor zu binden und dadurch Einfluss auf die Immunantwort zu nehmen, bezeichnet man Imiquimod auch als einen Immunmodulator. Aufgrund einer gefürchteten überschießenden Immunreaktion durch oben beschriebene Aktivierung inflammatorischer Signalwege wird der Immunmodulator zurzeit ausschließlich lokal als Creme angewandt. Zugelassen ist er für die oberflächliche Anwendung bei Basalzellkarzinomen, kutanen T-Zell-Lymphomen, aktinischer Keratose und Condylomata acuminata (Meyer et al. 2013). Ein weiterer TLR7-Agonist, für welchen zusätzlich eine oral applizierbare Form existiert und somit systemisch wirksam wäre, ist Resiquimod (Dockrell et al. 2001).

1.3.3 Der TLR7-Agonist Resiquimod (R848) als Weiterentwicklung

Der TLR7-Agonist Resiquimod, kurz R848, ist zur lokalen und systemischen Anwendung ausschließlich im experimentellen Bereich verfügbar. Durch das erweiterte Anwendungsspektrum und die zusätzliche Bindung an TLR8 stellt R848 eine Weiterentwicklung von Imiquimod dar. Eine Zulassung zur klinischen Anwendung konnte bisher nicht erreicht werden. Die Bindung an TLR7 und TLR8 setzt die gleiche Signalkaskade wie im Rahmen einer Virusinfektion in Gang (Hemmi et al. 2002). Während einer Virusinfektion befällt das Virus die Zelle, um deren Mechanismen zur Replikation zu nutzen. Bei Applikation des Agonisten besteht keine Replikationsfähigkeit, weshalb bei therapeutischer Anwendung eine Mehrfachapplikation notwendig wird.

Zusammenfassend können TLR7-Agonisten die Aktivierung des Immunsystems gezielt beeinflussen. Dadurch wurden sie in der Behandlung von Infektionskrankheiten und hauptsächlich für die Immuntherapie von Krebserkrankungen interessant (Vacchelli et al. 2013). Tumorzellen besitzen die Fähigkeit dem körpereigenen Immunsystem zu entkommen und darüberhinaus die Immunzellen in einen anergen Zustand zu versetzen (Lee et al. 1999, Dyck et al. 2017). Durch die Anwendung von TLR7-Agonisten könnten Immunzellen im suppressiven Tumormilieu ihre zytotoxische und proinflammatorische Aktivität zurückerlangen. Über eine Reaktivierung der körpereigenen Abwehr können entartete Zellen somit wieder erkannt und eliminiert werden (Pauken et al. 2015). Die

Aktivierung des Immunsystems über einen TLR7-Agonisten kann aber sowohl zu pro- als auch zu antiinflammatorischen Signalen führen (Conroy et al. 2008). Suppressiv Signale sind notwendig, um größere Kollateralschäden durch eine überschießende Aktivierung zu unterbinden. Aus diesem Grund sind der genaue Wirkungsmechanismus von TLR-Agonisten und die Auswirkungen auf die Immunantwort Gegenstand der aktuellen Forschung.

1.4 Fragestellung

In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass die Therapie mit einem TLR7-Agonisten zur Tumorabstoßung des NK-Zell-sensitiven Lymphommodells RMA-S geführt hat (Wiedemann et al. 2016). Da dieses Ergebnis in NK-Zell-depletierten Mäusen verloren ging, kann die Tumorabstoßung als NK-Zell-abhängig angenommen werden. Die genauen Auswirkungen von TLR7-Agonisten auf NK-Zellen sind bisher jedoch wenig untersucht. Unsere Vorversuche zeigten, dass NK-Zellen nach Therapie mit TLR7-Agonisten präferenziell in die Leber wandern (unpublizierte Daten). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit steht daher die Migrationsbewegung der aktivierten NK-Zellen in die Leber im Vordergrund. Zum einen soll dazu der Einfluss des TLR7-Agonisten R848 auf die Aktivierung von NK-Zellen und deren Migration dargestellt werden. Außerdem ist eine Phänotypisierung der aktivierten und eine Charakterisierung der in die Leber migrierten NK-Zellen von besonderem Interesse. Zuletzt wird die Leber selbst auf chemotaktisch wirksame Veränderungen nach R848-Applikation analysiert. Zusammenfassend ergeben sich die folgenden Punkte als Ziele dieser Arbeit:

1. Untersuchung der Effektivität und Spezifität einer gezielten NK-Zell-Aktivierung durch den TLR7-Agonisten R848
2. Migrationsverhalten von NK-Zellen nach Aktivierung mit R848
 - a. Phänotypisierung aktivierter NK-Zellen
 - b. Charakterisierung des Chemokinprofils im Zielorgan
 - c. Untersuchung einer hypothetischen Migrationsachse *in vitro*
3. Validierung der untersuchten Migrationsachse im Mausmodell

Ein besseres Verständnis dieser Mechanismen könnte helfen, die NK-Zellaktivierung gezielter zu nutzen und zur Weiterentwicklung und neuen Anwendungsmöglichkeiten von TLR7-Agonisten beitragen.

2. Material

2.1. Reagenzien und Chemikalien

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
BD Pharm Lyse Lysing Buffer (10 x)	BD Biosciences (New Jersey USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DNase I	Roche (Mannheim, Deutschland)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Dulbecco's modified Eagles medium DMEM	Lonza (Basel, Schweiz)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Lonza (Basel, Schweiz)
Ethanol 100 %	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Heparin-Natrium 2.500 IE / 5 ml	B.Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure (HEPES)	Lonza (Basel, Schweiz)
Isofluran	Abbott (Zug, Schweiz)
Isopropanol (70 %, 100 %)	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
Kollagenase D	Roche (Mannheim, Deutschland)
L-Glutamin	Lonza (Basel, Schweiz)
Natriumchlorid 0,9 %	Apotheke Innenstadt (LMU München, Deutschland)
Percoll®	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Resiquimod (R848)	Enzo Life Sciences (Lörrach, Deutschland)
Roswell Park Memory Institute (RPMI)	Lonza (Basel, Schweiz)
Trypan-Blau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Trypsin (10 x)	Lonza (Basel, Schweiz)

Tween 20 Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.2 Puffer und Medien

Erylyse Puffer: 10 % BD Pharm Lyse in destilliertem Wasser

MACS Puffer: 2mM EDTA
1 % BSA
10 % FCS in PBS

Zytotox Medium: 1 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin
1 % Natriumpyruvat
1 % HEPES in RPMI 1640 (ohne Phenolrot)

Tumormedium: 10 % FCS
2 mM L-Glutamin
100 IU / ml Penicillin
100 µg / ml Streptomycin in DMEM

Migrations-Medium: 0,1 % BSA
100 IU / ml Penicillin
100 µg / ml Streptomycin in RPMI 1640
(ohne Phenolrot)

Dichtegradient: 37,5 % Percoll®-Lösung
62,5 % Natriumchlorid-Lösung
100 U / ml Heparin

2.3 Kommerzielle Reagenziensets

Bradford Assay Bio-Rad (Hertfordshire, England)

EasySep™ Mouse NK Cell Isolation Kit	StemCell Technologies (Vancouver, Kanada)
NK-Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Proteome Profiler Mouse Chemokine Array Kit	R&D Systems (Minneapolis, USA)
RevertAid cDNA First Strand Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RT ² First Strand Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RT ² PreAMP cDNA Synthesis Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RT ² Profiler PCR Array	Qiagen (Hilden, Deutschland)

2.4 FACS Antikörper

Tabelle 1: Fluorochrom-konjugierte FACS-Antikörper

Antigen	Klon	Reaktivität	Herkunft	Verdünnung
anti-CCR5	HM-CCR5	Maus	BioLegend	1:400
anti-CD3	17-A2	Maus	BioLegend	1:400
anti-CD11b	M1/70	Maus/Mensch	BioLegend	1:400
anti-CD11c	N418	Maus	BioLegend	1:400
anti-CD69	H1.2F3	Maus	BioLegend	1:400
anti-CD96	3.3	Maus	BioLegend	1:400
anti-CD226	10E5	Maus	BioLegend	1:400
anti-CXCR3	CXCR3-173	Maus	BioLegend	1:400
anti-NK1.1	PK136	Maus	BioLegend	1:400
anti-NKG2D	CX5	Maus	BioLegend	1:400
Anti-Nkp46	29A1.4	Maus	BioLegend	1:400
anti-CMKLR1	BZ194	Maus	Novus Biologicals	1:1000

anti-Rat(H+L) AlexaFluor488	-	Ratte	Jackson ImmunoResearch	1:400
Zombie AQUA™	-	Maus	BioLegend	1:1000
Cell Proliferation Dye eFluor™ 450	-	Maus	ebioscience™	1:1000

Die Antikörper wurden in einem Mastermix zur Färbung in einer Konzentration von 0,25 µg pro 1 Million Zellen verwendet. Der Farbstoff zur Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen wird am Ende in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt. Bei der Detektion des Chemerin-Rezeptors CMKLR1 wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Methode gewählt. Zur Bestimmung der Bindungsspezifität wurden die entsprechenden Isotyp-Kontrollen verwendet.

2.5 Geräte

Amicon Zentrifugenfilter (3 kD bzw. 30 kD)	Millipore (Schwalbach, Deutschland)
CO ₂ – Brutschrank (BD6220)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
FACSCanto II	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Gefrierschrank -80°C	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Kühl- und Gefrierschränke 4 °C, -20 °C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss (Jena, Deutschland)
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi (Bergisch Gladbach, Deutschland)

Mithras LB940 ELISA Reader	Bertold (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifuge 3L-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Multifuge 4KR	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Nanophotometer	Implen GmbH (München, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Optik Labor Frischknecht (Balgach, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Vortex	Janke & Kunkel (Staufen, Deutschland)
Waage CPA 1003S	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Zentrifuge 5424	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.6 Software

Tabelle 2: Software

Software	Hersteller
Affinity Designer	Serif (Europe) Ltd, Nottinghamshire, GB
EndNote X8	Thomson Reuters, NYC, USA
FACS DIVA	BD Biosciences, New Jersey, USA
FlowJo 10.4	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, Inc., San Diego, USA
ImageJ	NIH, Maryland, USA
Microsoft Office	Microsoft Corporation, Redmond, USA
GeneGlobe	Qiagen, Venlo, Niederlande

3. Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 Mäuse

Weibliche C57Bl/6 wurden von Charles River (Deutschland) bezogen. Die Tiere werden im Alter von 8 Wochen geliefert und sind nach 7 Tagen Adaptation versuchsbereit. Die Tierversuche wurden von der zuständigen Behörde genehmigt.

3.1.2 *In-vivo* Stimulation mit dem TLR7-Agonist R848

Um eine ausreichende Stimulation der NK-Zellen für *in-vitro* Versuche zu gewährleisten, wurden die Immunzellen in einem Zeitabstand von 12 Stunden vor Versuchsbeginn *in-vivo* stimuliert. Dazu wurden 2 mg/kg Körpergewicht des TLR7-Agonisten Resiquimod (R848) in PBS gelöst und in einem Gesamtvolumen von 100 µl pro Maus subkutan in die Flanke injiziert. In Vorversuchen zur Kinetik des Medikaments konnte gezeigt werden, dass 12 Stunden postinjektionem das Optimum der Stimulation erreicht ist und anschließend das Aktivierungsniveau der Immunzellen wieder beginnt abzunehmen.

3.1.3 *In-vivo* Neutralisation mit monoklonalen Antikörpern

Zur Validierung eines identifizierten Rezeptors wurde in dieser Arbeit eine entsprechende Neutralisation im Mausmodell durchgeführt. Um die Auswirkungen des Rezeptors zu untersuchen, erhielt sowohl eine R848-therapierte Gruppe sowie eine Kontrollgruppe den neutralisierenden Antikörper. Am Tag vor der Stimulation wurde ein Rezeptor-blockierender, monoklonaler Antikörper (hier CMKLR1) in der Konzentration 1 mg/ml intraperitoneal injiziert. Der Antikörper blockiert im Rahmen der Stimulationsuntersuchung die Bindungsstellen des Rezeptors, wodurch die Bindung von in diesem Fall Chemerin nicht mehr möglich ist. Die Kontrollgruppe erhielt den Isotyp IgG1-kappa in der äquivalenten Konzentration und in gleicher Anwendung. Im Folgenden wurde eine Stimulation mit R848 wie oben beschrieben durchgeführt. Zum besseren Verständnis ist in Tabelle 3 die Gruppeneinteilung dargestellt.

Tabelle 3: Gruppeneinteilung des *in-vivo* Versuchs

	ohne Therapie	mit Therapie
keine Depletion	Trägerlösung PBS + Isotyp Maus IgG1	TLR7-Agonist R848 + Isotyp Maus IgG1
Depletion	Trägerlösung PBS+ anti- Chemerin-AK	TLR7-Agonist R848 + anti- Chemerin-AK

3.1.4 Adoptiver NK-Zelltransfer

Zur Beurteilung markierter Immunzellen im lebenden Organismus wurde ein Zelltransfer in zwei Schritten durchgeführt. Aus Spendermäusen wurden nach unten beschriebenen Methoden zuerst die Gesamtsplenozyten extrahiert und anschließend die NK-Zellpopulation separiert. Die Zellen wurden mit einem Farbstoff markiert, der an die Bestandteile der Zellmembran bindet und auch noch nach stattgefundenen Zellteilung detektierbar ist. Die markierten NK-Zellen wurden den Empfängeremäusen im nächsten Schritt über die Kaudalvene transferiert.

3.2 Zelluläre Methoden

3.2.1 Gewinnung von Splenozyten

Unter Isofluran-Anästhesie werden die Mäuse durch einen Genickbruch getötet, wodurch eine nicht mit dem Leben vereinbare Verletzung gewährleistet ist. Nach anschließender Milzentnahme wird diese mit FBS-angereichertem Medium durch mehrmalige Injektion ausgespült, um bereits einen Großteil der darin befindlichen Lymphozyten möglichst zellschonend auszuschwemmen. Das restliche Milzgewebe wird unter Spülen durch ein 30 µm Sieb gepresst. Mit einem speziellen Erylyse-Puffer wird die Zellsuspension von Erythrozyten befreit. Zur weiteren Verwendung können die gewonnenen Splenozyten in entsprechendem Medium (z.B. T-Zell Medium) aufbewahrt werden.

3.2.2 Gewinnung von intrahepatischen Immunzellen

Nach erfolgter, wie oben beschriebener Tötungsmethode, wird die Leber entnommen. In einer Petrischale wird diese mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Die Organmasse wird anschließend mit Kollagenase und DNAse bei 37°C auf einem *Thermoshaker* für 30 Minuten inkubiert. Die verdaute Organmasse wird durch ein 100

µm Zellsieb gespült. Die gewonnene Zellsuspension wird nach mehreren Zentrifugationsschritten auf eine 37,5 %-ige Percoll Lösung aufgetragen. Anschließend wird die Lösung ohne Abbremsen oder Unterbrechung 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Zellsuspension hat sich nun dem Dichtegradient folgend in eine obere Hepatozytenschicht und eine untere Immunzellschicht aufgeteilt (Blom et al. 2009). Die obere Schicht inklusive der restlichen Percoll-Lösung wird vorsichtig abgesaugt, ohne die Lymphozytenschicht zu berühren. Nach mindestens zwei Waschschritten mit NaCl oder PBS können die intrahepatischen Immunzellen für weitere Experimente verwendet werden.

3.2.3 Herstellung von Organlysaten

Die gewünschten Organe werden nach erfolgter Tötung entnommen und sofort in flüssigen Stickstoff eingetaucht. Mit Mörser und Pistill werden die Organe unter ständiger Zugabe von Stickstoff so lange zerrieben, bis eine homogene pulverartige Masse entsteht. Diese wird anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und mittels Lysepuffer des *Bio-Plex Lysis Kit* aufgelöst. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wird die Masse auf dem Vortexer gemischt und anschließend 15 Minuten bei maximaler *g* Zahl zentrifugiert. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt mittels Bradford Analyse. Die generierten Überstände können bei -20°C gelagert werden.

3.2.4 Migration Assay

Um das Migrationsverhalten verschiedener Zellpopulationen zu untersuchen, verwendet man eine *Transwell*-Platte. Bei dieser Platte handelt es sich genauer um zwei Platten, die durch eine Membran unterschiedlicher Porengröße getrennt sind. In den hier beschriebenen Versuchen wurde mit einer 3 µm Porengröße gearbeitet. In der oberen Kammer wird ein lymphozyten-angereichertes Zellgemisch eingesetzt oder unbehandelte ganze Splenozytensuspensionen mit einer Zellzahl von circa 1 Million. Die untere Kammer stellt den Zielort der Migrationsbewegung dar und beinhaltet die zu untersuchenden chemotaktisch wirksamen Proteine. Sowohl die Zellen der oberen Kammer als auch die Zellen der unteren Kammer werden in einem nährstoffarmen Medium kultiviert, um ein künstliches Konzentrationsgefälle durch die in Vollmedien enthaltenen Proteine zu vermeiden. Je nach eingesetzter Zellpopulation variiert die Inkubationszeit zwischen 4 und 6 Stunden. Am Ende der Inkubationszeit werden, die in der unteren Kammer angekommenen Zellen in eine neue Platte transferiert und mit fluoreszierenden Antikörpern angefärbt. Mit der Verwendung von *counting beads* wird durchflusszytometrisch die Art und Anzahl der gewanderten Zellen ermittelt.

3.2.5 Chemokine Array

Der Array dient der Analyse der Chemokinexpression in Gewebelysaten, Zellüberständen oder Seren. Das Kit enthält eine Nitrozellulosemembran, an der bereits die zu untersuchenden Chemokinantikörper mit entsprechenden Kontrollen gebunden sind. Die Proben werden in einem vom Hersteller mitgelieferten Puffer verdünnt und mit einem an Biotin gekoppelten Antikörper vermengt. Die Lösung wird auf die Membran aufgetragen und über Nacht auf einem *Rocky Shaker* bei 4°C inkubiert. Um überschüssiges, nicht gebundenes Material zu entfernen, wird die Membran in mehreren Waschschritten gereinigt. Anschließend werden HRP-konjugiertes Streptavidin und ein chemilumineszierendes Reagenz aufgetragen. Die Proteine erscheinen in unterschiedlichen Graustufen als Duplikate auf der Membran und können mit einer Schablone dem entsprechenden Chemokin zugeordnet werden. dabei korreliert die Intensität der Punkte mit der in den Proben enthaltenen Chemokinkonzentration. Zum Auslesen des *arrays* wurde mit *ImageJ* die Intensität der Farbpunkte bestimmt und in einen numerischen Wert umgewandelt.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Isolierung einer Zellpopulation mittels magnetischer Zellseparation

Um aus einer gemischten Zellsuspension eine bestimmte Population zu isolieren, gibt es verschiedene Verfahren. In dieser Arbeit wurden die NK-Zellen vorwiegend mit Hilfe des *EASYSep™ NK Cell Isolation Kit* separiert. Die Zellsuspension wird auf eine Konzentration von 10^8 Zellen/ml in einem sterilen FACS-Röhrchen eingestellt. Durch Zugabe eines Gemischs aus biotinylierten Antikörpern, die diverse Oberflächenmarker erkennen und binden, werden alle Zellen bis auf die NK-Zellpopulation markiert. Im nächsten Schritt werden mit Streptavidin versehene magnetische Partikel zugegeben. Während einer Inkubationszeit von circa 10 Minuten kommt es zur Ausbildung einer Streptavidin-Biotin-Bindung zwischen den markierten Zellen und den magnetischen Partikeln. FACS-Röhrchen wird in einem speziellen Magneten platziert und für weitere 5 Minuten inkubiert. In dieser Zeit sammeln sich alle magnetisch-markierten Zellen an der Wand des Röhrchens. Beim schwingvollen Ausgießen der restlichen Zellsuspension verbleiben die magnetisch aktivierten Zellen im Röhrchen, während alle unmarkierten Zellen (in diesem Fall NK-Zellen) in ein neues Gefäß überführt werden können. Aus den Herstellerangaben ist bekannt, dass eine Bindung mit magnetischen Partikeln zu einer Aktivierung der Immunzellen führt. In den hier dargestellten Experimenten könnte diese Eigenschaft das Ergebnis verfälschen, weshalb ausschließlich nach der beschriebenen Methode eine so genannte "Negative

Selektion" durchgeführt wurde.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie, auch genannt FACS (*fluorescence-activated cell sorting*), dient der Differenzierung eines Zellgemischs in seine einzelnen Zellbestandteile. Die zu untersuchenden Zellen werden in einer Farbstoff-freien Pufferlösung in einer Konzentration von circa 10^6 Zellen gelöst. Die Zellen eines Gemischs können durch die Expression ihrer Oberflächenantigene, sowie durch ihre Größe und Granularität differenziert werden. Dazu wird die Zellsuspension mit entsprechenden Antikörpern inkubiert, die an unterschiedliche Fluorochrome gebunden sind. Durch die Anregung des Fluorochroms mit einem Laser bestimmter Wellenlänge kann die Emission der markierten Zellen detektiert werden. Zudem kann durch die Größen- und Granularitätsbestimmung das Zellgemisch in Subpopulationen wie Lymphozytenpopulation oder Tumorzellen unterteilt werden. Durch das Verwenden mehrerer Antikörper für einen Zelltyp können die Subpopulationen genauer charakterisiert werden.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 RNA Isolation mit Trizol

Trizol oder auch Guanidiniumthiocyanat ist eine chemische Verbindung zur Extraktion von DNA, RNA und Proteinen aus Zellen. Eine Zellsuspension mit maximal 1 Million Zellen pro Mililiter wird zentrifugiert, um die Zellen bestmöglich vom Medium zu trennen (z.B. in einem Eppendorf *Tube*). Das verbliebene Zellpellet wird in 1 ml Trizol gelöst und fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 0,2 ml Chloroform pro Mililiter Trizol hinzugefügt und das Gemisch etwas fünfzehn Sekunden geschüttelt. Es erfolgt eine erneute Inkubationszeit von zwei bis drei Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt trennen sich die Phasen der Emulsion. In der obersten, wässrigen Phase befindet sich dabei die isolierte RNA und kann mit einer Pipette vorsichtig in ein neues Gefäß überführt werden. Die gewonne RNA wird mit Isopropanol gewaschen, zentrifugiert und das gelartige Pellet in gewünschter Konzentration in zweifach destilliertem Wasser gelöst. Zur Quantifizierung und Qualitätsbestimmung wird die Konzentration an einem *NanoDrop*-Gerät gemessen.

3.4.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription handelt es sich um das Ablesen der RNA zur Erstellung einer komplementären DNA, auch genannt cDNA. Damit die RNA gelesen werden kann, benötigt man für die Reaktion das Enzym „Reverse Transkriptase“, welche als RNA-abhängige DNA-Polymerase funktioniert. Dieses Enzym gleitet an der RNA entlang und sucht sich aus der Suspension die komplementären Nukleinbasen, die zuvor dem Reaktionsgemisch in ausreichender Konzentration hinzugefügt wurden. Sobald der RNA-Strang abgelesen ist, wird die RNA bis auf kleines Endstück abgebaut. Diese terminale Sequenz dient der DNA-abhängigen DNA-Polymerase als Start, um aus der bisher einzelsträngigen eine nun doppelsträngige DNA zu generieren.

3.4.3 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein Verfahren zur Vervielfältigung der DNA oder bestimmter DNA-Abschnitte mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Im Allgemeinen werden die drei Phasen Denaturierung, Hybridisierung und Elongation unterschieden. Zur Vervielfältigung wird im ersten Schritt die zu amplifizierende DNA erhitzt, bis die Wasserstoffbrücken zwischen der Doppelhelix sich lösen und die Einzelstränge vorliegen. Erst dann kann im zweiten Schritt eine kurze Nukleotid-Sequenz, genannt *primer*, temperaturabhängig an die DNA binden, die als Startpunkt für das Enzym DNA-Polymerase notwendig ist. Jetzt kann das Enzym im letzten Schritt die DNA entlang wandern und die fehlenden Nukleotide aus der Suspension zur Vervollständigung eines neuen Doppelstrangs einbauen. Das Endprodukt einer PCR wird auf ein Agarose-Gel aufgetragen und nach Ablauf der Elektrophorese anhand der Größe bestimmt.

3.4.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei dieser erweiterten PCR-Methode wird durch eine zusätzliche Fluoreszenzmarkierung das Endprodukt quantifiziert. Dazu gibt es unterschiedliche Varianten der Markierung, wie z.B. die direkte DNA-Markierung mit Farbstoffen oder fluoreszierende Hybridisierungssonden, die bestimmte DNA-Bereiche selektiv binden. In den Experimenten dieser Arbeit wurde dazu der Farbstoff SYBR Green verwendet, der direkt mit der DNA interkaliert und somit bei zunehmender DNA-Menge ein stärkeres Fluoreszenzsignal produziert wird. Zur Normalisierung werden die Resultate der regulierten Gene mit konstitutiv exprimierten Genen, so genannten *housekeeping genes*, ins Verhältnis gesetzt.

3.5 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mit dem Programm GraphPad Prism 8 durchgeführt. Da bei allen Datenpunkten von einer Normalverteilung ausgegangen werden kann, wurde als statistischer Test der Zweistichproben-Test (t-Test) für unverbundene oder verbundene Stichproben gewählt.

4. Ergebnisse

4.1 TLR7-Agonist R848 induziert NK-Zell-Migration in die Leber

4.1.1 Aktivierte, reife NK-Zellen migrieren durch Stimulation mit R848 aus der Milz in die Leber

In den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass nach der Behandlung mit dem TLR7-Agonisten R848 ein Einwandern der NK-Zellen in die Leber stattfindet. Nach einem adoptiven NK-Zelltransfer fanden sich in der behandelten Gruppe die injizierten und markierten NK-Zellen vermehrt in der Leber wieder, während in der unbehandelten Gruppe ein anderes Verteilungsmuster vorzufinden war.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde das Migrationsverhalten der in der Maus vorhandenen NK-Zellen nach Stimulation mit R848 ohne einen adoptiven Zell-Transfer untersucht. Dazu wurden gesunden C57Bl/6 Mäusen eine Suspension aus PBS und R848 in einer Konzentration von 2 mg pro Kilogramm Körpergewicht subkutan in die Flanke verabreicht. Nach 12 Stunden wurden den therapierten Mäusen und einer mit Trägerlösung injizierten Kontrollgruppe Milz und Leber entnommen. In vorherigen Experimenten wurde die Kinetik des *small molecules* R848 untersucht und ein Stimulationsmaximum nach 12 Stunden erruiert. Nach Anfärben der Lymphozytenangereicherten Zellsuspensionen beider Organe mit den entsprechenden Antikörpern konnte durchflusszytometrisch die Aufteilung der Immunzellen quantifiziert werden. Vergleichbar mit den Ergebnissen nach Zell-Transfer-Experimenten, findet auch eine Umverteilung der physiologisch vorhandenen NK-Zellen in der R848-therapierten Gruppe statt (Abbildung 2 A - C).

Um das Migrationsverhalten der Zellen besser verstehen zu können ist eine Analyse der exprimierten Oberflächen-Rezeptoren auf NK-Zellen notwendig. Dazu wird das Rezeptorprofil der NK-Zellen aus Milz und Leber des gleichen Versuchs untersucht. Im gleichen Versuchsaufbau konnten in einem weiteren Schritt diese Oberflächenrezeptoren zusätzlich angefärbt und durchflusszytometrisch dargestellt werden. Nahezu alle migrierten Zellen zeigten eine fast 100-prozentige Expression des Aktivierungsmarkers CD69. Auch der NK-Zell aktivierende Rezeptor NKG2D wurde durch die Stimulation mit R848 induziert. Das Oberflächenantigen CD11b, welches nicht nur von Makrophagen exprimiert wird, sondern auch mit dem Reifungsgrad von NK-Zellen korreliert, ist auf NK-Zellen der Leber in der mit dem TLR7-Agonisten behandelten Gruppe deutlich hochreguliert.

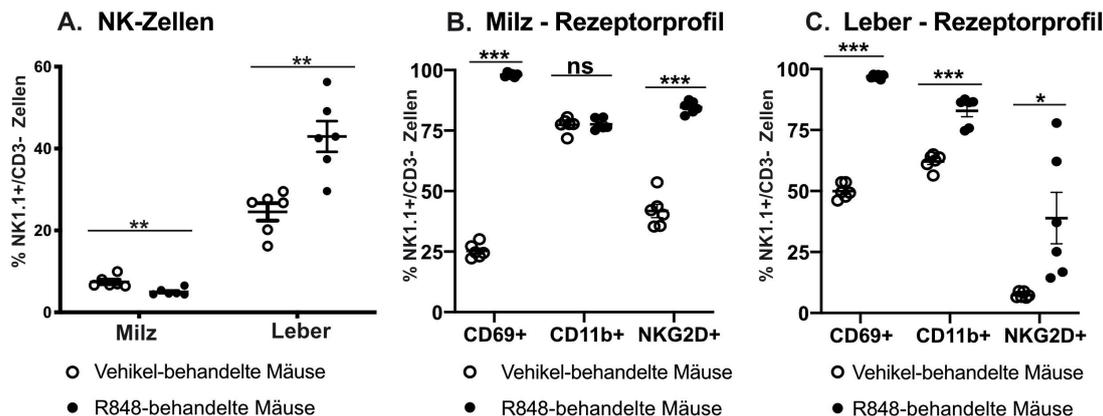


Abbildung 2: Durch die Behandlung mit dem TLR7-Agonisten R848 findet eine Umverteilung aktivierter und reifer NK-Zellen aus der Milz in die Leber statt

C57/Bl6 Mäuse wurden subkutan mit je 2 mg/kg R848 gelöst in 100 μ l PBS therapiert. 12 Stunden nach Applikation wurden Milz und Leber entnommen und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Aus der Leber wurden die intrahepatischen Immunzellen mit einem Dichtegradienten isoliert. Durchflusszytometrisch wurden nach Anfärben mit Fluorochrom-tragenden Antikörpern die relativen Werte bestimmt. Zum Ausschluss der NK/T-Subpopulation wurden nur die NK1.1-positiven und CD3-negativen Zellen berücksichtigt (A-C). Die Aktivierungsmarker CD69 und NKG2D sind in Milz und Leber deutlich erhöht in der behandelten Gruppe. Der Reifemarker CD11b ist auf NK-Zellen der Leber in der behandelten Gruppe hochreguliert.

Als Kontrollgruppe dienten genetisch identische C57Bl6 Vehikel-behandelte Mäuse.

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=5 Mäuse pro Gruppe) + SEM; repräsentativ für 5 unabhängige Versuche.

*p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005, Testart: unverbundener t-Test.

4.1.2 CD3-positive T-Zellen zeigen keine Migration in die Leber nach Behandlung mit R848

Durch die endosomale Bindung des TLR7-Agonisten in DC, wird eine allgemeine Aktivierung des Immunsystems initiiert. Die Freisetzung von Zytokinen mobilisiert nicht nur NK-Zellen, sondern in großem Ausmaß auch T-Zellen und Makrophagen (Hallam et al. 2009). Aus diesem Grund wurde im nächsten Versuch überprüft, ob eine Stimulation auch zu einer Anreicherung der prozentual größeren T-Zell-Population in der Leber führt. Eine Gruppe von fünf Mäusen wurde mit dem TLR7-Agonisten R848 behandelt. Wie in vorherigen Versuchen wurde nach einer Stimulationszeit von 12 Stunden die Leber entnommen. Als Kontrollgruppe dienten mit Vehikellösung behandelte Mäuse gleichen Alters und Geschlechts. Die Leber wurde zerkleinert und in einer Suspension aus Kollagenase und DNase verdaut. Nach Anfärben mit Fluorochrom-gebundenen Antikörpern wurde die absolute Anzahl der T- und NK-Zellen durchflusszytometrisch und mit Hilfe von *counting beads* berechnet.

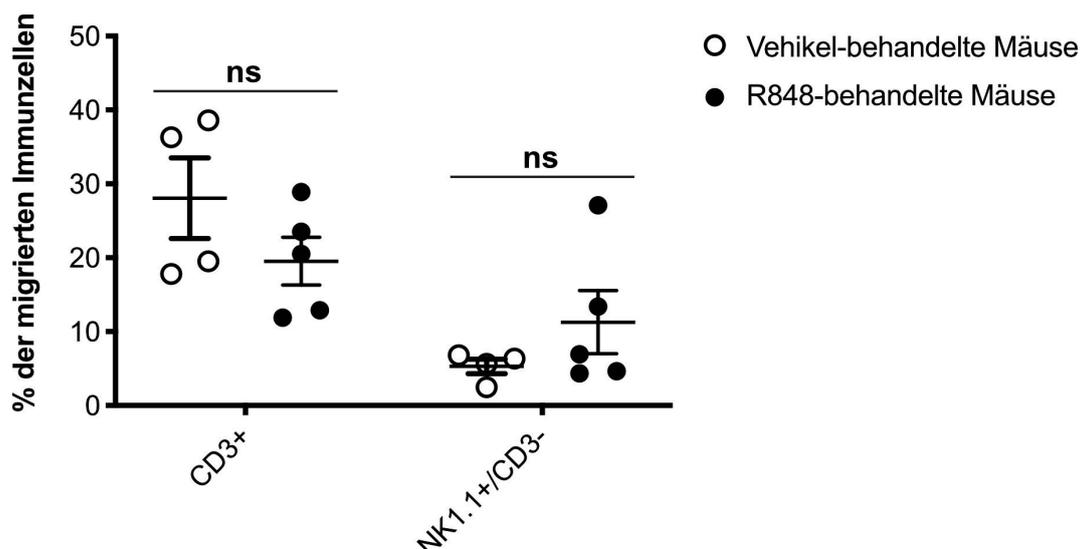


Abbildung 3: Anzahl der intrahepatischen CD3+ und NK1.1+ Immunzellen mit und ohne Stimulation mit R848

C57BL/6 Mäuse (n=5 pro Gruppe) wurden subkutan mit 2 mg/kg R848 oder Vehikellösung therapiert. Nach ca. 12 h wurden die Mäuse euthanisiert und die Leber entnommen. Die intrahepatischen Immunzellen wurden mit Fluorochrom-gebundenen Antikörpern gefärbt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der in die Leber migrierten T- und NK-Zellen. Die Stimulation mit R848 führt nicht zu einer Anreicherung von T-Zellen in der Leber.

Angezeigt sind die Mittelwerte (n=4 Mäuse in der Kontroll-Gruppe, n=5 Mäuse in der behandelten Gruppe) + SEM, *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005. Testart: unverbundener t-Test; repräsentativ für 5 unabhängige Wiederholungen.

4.1.3 In die Leber migrierte NK-Zellen zeigen eine verstärkte Expression von CCR5

Zur spezifischeren Charakterisierung der NK-Zellen, die nach R848-Applikation in die Leber gewandert sind, ist eine Unterscheidung zwischen migrierten und in der Leber ansässigen NK-Zellen notwendig. Dies wurde durch einen adoptiven Zelltransfer erreicht. Aus C57Bl/6-Mäusen wurden NK-Zellen mittels magnetischer Zellseparation isoliert, mit einem Proliferationsfarbstoff markiert und den Empfänger-mäusen intravenös appliziert. Alle Mäuse erhielten anschließend den TLR7-Agonisten R848 in üblicher Dosierung und als subkutane Injektion. Nach 24 Stunden wurden Milz und Leber entnommen. Die mit Proliferationsmarker gefärbten, transferierten NK-Zellen wurden mittels FACS-Sorting aufgereinigt und zur RNA-Isolation verwendet (Abb. 4).

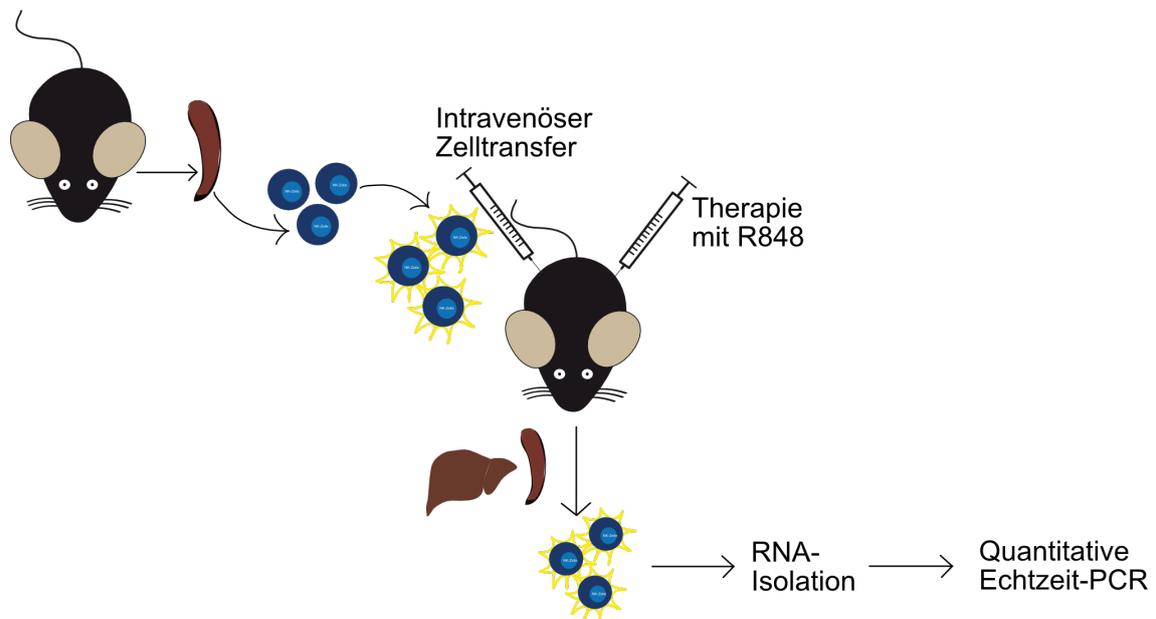


Abbildung 4: Versuchsaufbau eines adoptiven NK-Zell-Transfers

C57Bl/6-Wildtyp Mäuse dienen als Spendertiere zur Gewinnung von Splenozyten. Nach Aufreinigung und magnetischer Isolation werden die Spenderzellen mit einem Proliferationsfarbstoff markiert, der sich auch noch nach in vivo Applikation nachweisen lässt. Die markierten NK-Zellen werden den Empfängermäusen intravenös injiziert. Gleichzeitig findet die Therapie aller Empfängertiere mit dem TLR-7 Agonisten R848 statt. Nach 24 Stunden werden die Immunzellen aus Milz und Leber isoliert und zusätzlich mit NK-Zell-spezifischen Antikörpern gefärbt. Mit Hilfe eines FACS-Gerätes mit Sortierfunktion können die doppelt markierten und damit migrierten NK-Zellen isoliert werden. In diesem Experiment wurde aus den isolierten Zellen anschließend die RNA gewonnen und zur weiteren Analyse in cDNA umgeschrieben.

Die so gewonnene RNA wurde mittels q-RT-PCR auf verschiedene Gene der angeborenen und adaptiven Immunantwort untersucht. Unter allen untersuchten Genen zeigte sich CCR5 am stärksten induziert auf in die Leber migrierten NK-Zellen (Abb. 5). Die Expressionsmuster auf NK-Zellen, welche aus der Milz gewonnen wurden, verstehen sich hierbei als Basisexpression.

	01	02	03	04	05	06
A	Apcs	C3	C5ar1	Casp1	CCL12	CCL5
	1.26	1.26	1.26	-151.17	1.26	1.28
B	CD40	CD40lg	CD80	CD86	CD8a	CRP
	1.26	-2.48	13.09	1.26	1.26	1.26
C	GATA3	H2-Q10	H2-T23	ICAM1	IFNa2	IFNAR1
	1.26	1.26	-2.01	-163.14	1.26	1.26
D	IL18	IL1a	IL1b	IL1R1	IL2	IL23a
	1.26	1.26	1.26	1.47	1.26	1.26
E	ITGAM	JAK2	Ly96	LyZ2	MAPK1	MAPK8
	-3.14	1.26	-2.62	1.26	1.34	1.26
F	NLRP3	Nod1	Nod2	Rag1	RORC	SLC11a1
	-13.27	3.05	1.26	1.26	-59.71	1.26
G	TLR1	TLR2	TLR3	TLR4	TLR5	TLR6
	1.26	-73.01	1.26	-7.57	1.26	4.03

	07	08	09	10	11	12
A	CCR4	CCR5	CCR6	CCR8	CD14	CD4
	1.05	179.77	1.26	1.28	1.26	1.26
B	CSF2	CXCL10	CXCR3	DXD58	FasL	FOXP3
	-7.31	-2.81	-1.36	1.26	-72.50	1.26
C	IFNb1	IFNg	IFNgR1	IL10	IL13	IL17a
	1.26	1.91	2.19	1.26	1.26	-2.83
D	IL4	IL5	IL6	IRAK1	IRF3	IRF7
	1.26	1.26	1.26	1.26	2.50	-274.37
E	MBL2	MPO	Mx1	MyD88	NFkB1	NFkBla
	1.26	1.26	-2.23	1.29	-442.64	-3.27
F	STAT1	STAT3	STAT4	STAT6	Tbx21	TICAM1
	-2.51	1.39	-35.75	1.26	2.55	1.26
G	TLR7	TLR8	TLR9	TNF	TRAF6	Tyk2
	1.26	14.22	1.26	1.26	1.26	1.26

Abbildung 5: Expressionsmuster ausgewählter Proteine nach NK-Zell-Migration in Leber und Milz durch Stimulation mit R848.

Zu sehen sind ausgewählte Proteine aus einer Genexpressionsanalyse basierend auf einem Real-Time-PCR Assay. Als Kontrollgruppe gilt die Expression der Milz-NK-Zellen. Die Tabelle zeigt die relative Änderung (Fold regulation) der untersuchten Proteine der Leber-NK-Zellen im Vergleich zu den Milz-NK-Zellen. Negative Zahlenwerte entsprechen einer reduzierten Expression, positive Zahlenwerte sprechen für eine erhöhte Expression des dargestellten Proteins. Die Berechnung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Livak et al. 2001) unter Berücksichtigung des mit Hilfe des t-Tests berechneten p-Wertes. Die Datenanalyse erfolgte mittels der von Qiagen zur Verfügung gestellten GeneGlobe Software (www.qiagen.com/geneglobe). Als signifikant wird dabei eine relative Änderung mit einem Wert $> |1.5|$ bezeichnet. Rot markiert ist die relative Änderung von CCR5 in NK-Zellen der Leber. Dargestellt ist eine Wiederholung, durchgeführt mit extrahierten und gepoolten Zellen aus 5 Empfängermäusen.

4.2 Chemerin als potentes chemotaktisch auf NK-Zellen wirksames Zytokin

4.2.1 Erhöhte CXCL9- und Chemerin-Spiegel in der Leber R848-behandelter Mäuse

Da zelluläre Wanderungsbewegungen entlang eines Konzentrationsgradienten stattfinden, sollte mit diesem Experiment untersucht werden, welche Chemokine durch die Therapie mit R848 in der Leber induziert werden. In vorheriger Recherche wurden die häufigsten auf NK-Zellen wirksamen Chemokine ermittelt, um dann den adäquaten Assay zur Untersuchung der Leber zu bestimmen. Mit dem *chemokine array* von R&D konnte in einem Western-Blot-ähnlichen Verfahren eine Reihe an Proteinen analysiert werden. Aus behandelten und unbehandelten Mäusen wurde die Leber entnommen und Lysate hergestellt. Zur Bestimmung und Vereinheitlichung der eingesetzten Proteinmenge wurde im ersten Schritt ein *Bradford Assay* durchgeführt. Die Leberlysate wurden im Ganzen verwendet um alle Bestandteile als mögliche Chemokin-produzierende Kandidaten zu berücksichtigen. Da es sich um relative Werte handelt, wurden die Chemokine mit der größten Differenz zwischen therapiertes und nicht-therapiertes Gruppe berücksichtigt. Es zeigten sich erhöhte Level von CXCL12, CXCL9, CCL9/10, CCL12, CCL2, IL16, CCL6 und Chemerin in den Lebern R848-therapiertes Mäuse im Vergleich zu untherapiertes Mäusen (Abb. 6). Der deutlichste Unterschied zwischen den Gruppen war bei Chemerin zu erkennen, einem Chemokin, das besonders von weißen Fettzellen sezerniert wird.

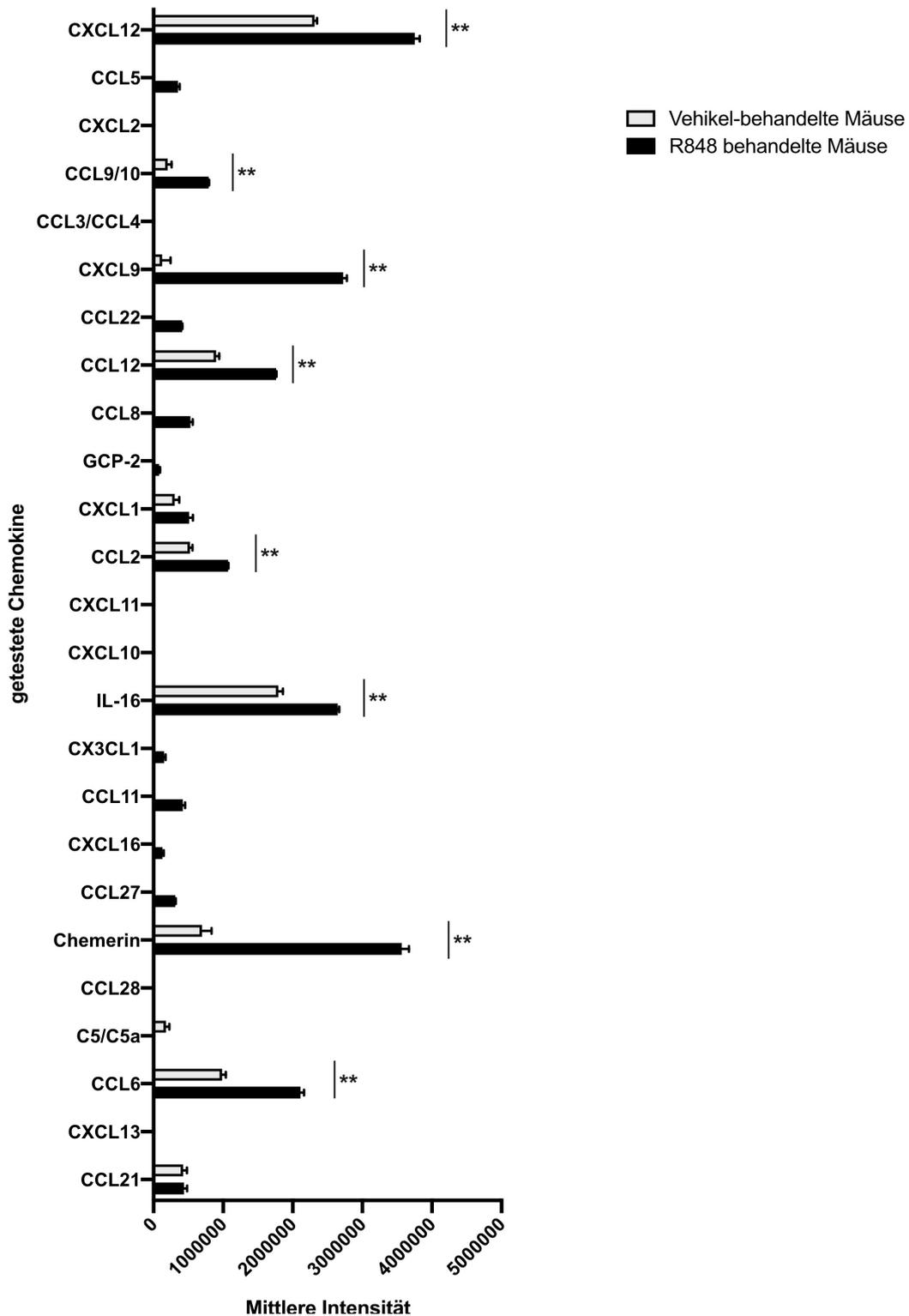


Abbildung 6: Veränderte Expression ausgewählter Chemokine in der Leber nach Therapie mit dem TLR7-Agonisten R848 im Vergleich zur Basalexpression in Vehikel-behandelten Mäusen.

Leber-Organlysate aus behandelten und unbehandelten Mäusen (Lysat aus 5 Organen pro Gruppe) wurden jeweils auf eine mit Chemokin-Detektionsantikörper vorgefertigte Membran aufgetragen und über Nacht inkubiert. Nach mehreren Waschschrinen und dem Auftragen Enzym-gebundener Detektionsantikörper können die gebundenen Proteine durch Chemilumineszenz sichtbar gemacht und abgelesen werden. Dargestellt ist der Mittelwert aus den aufgetragenen Duplikaten für jedes Protein (n=2) + SEM (*p < 0,05; **p < 0,005), repräsentativ für 3 unabhängige Wiederholungen; unverbundener t-Test.

4.2.2 Hochregulation des Chemerin-bindenden CMKLR1 Rezeptors auf stimulierten NK-Zellen

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, ob die in die Leber migrierten NK-Zellen, die den induzierten Chemokinen zugehörigen Rezeptoren exprimieren. Nachdem im vorherigen Versuch die Chemokine mit der größten Konzentrationsänderung durch R848 bereits determiniert wurden, konnten die entsprechenden Rezeptoren ermittelt werden. Aufgrund der verhältnismäßig größten Induktion von CXCL9 und Chemerin, fokussierte man sich in diesem Schritt auf die Rezeptoren CMKLR1 und CXCR3. Diese wurden auf der Oberfläche der NK-Zellen in Milz und Leber analysiert und zwischen R848-therapierten und untherapierten Gruppen verglichen. Der Chemerin-bindende Rezeptor CMKLR1 (oder ChemR) und der CXCR3-Rezeptor sind auf der Oberfläche von NK-Zellen konstitutiv vorhanden. Wir sahen einen signifikant erhöhten Prozentsatz ChemR+ NK-Zellen in der Leber der R848-therapierten Mäuse, wohingegen sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der CXCR3+ NK-Zellen zeigte (Abb. 7).

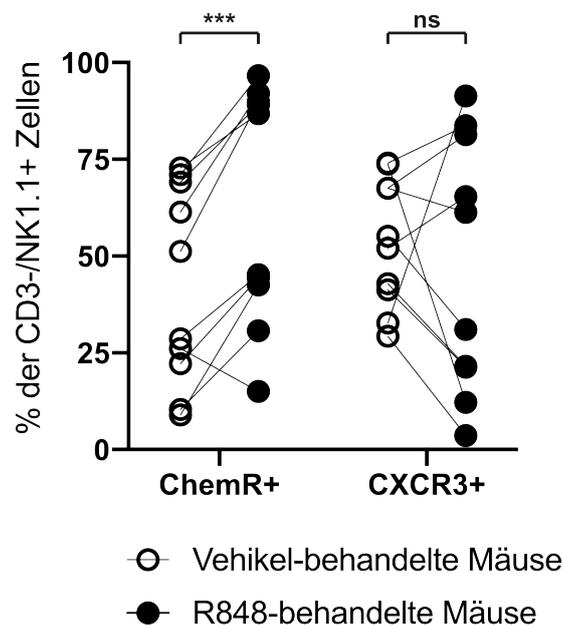


Abbildung 7: Rezeptorexpressionanalyse der Chemokin-bindenden Rezeptoren CMKLR1 (ChemR) und CXCR3 auf NK-Zellen der Leber nach Stimulation mit dem TLR7-Agonisten R848 im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen.

Nach 12-stündiger Stimulationszeit wurde die Leber entnommen und die intrahepatischen Immunzellen isoliert. Als Vergleichsgruppe dienten C57Bl/6 Vehikel-behandelte Mäuse. Dargestellt sind Ergebnisse aus zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils fünf Mäusen pro Gruppe und pro Versuch. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Individuum. Als statistischer Test diente der abhängige t-Test mit folgendem Signifikanzniveau: ns = nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005. Repräsentativ für 3 unabhängige Wiederholungen.

4.2.3 NK-Zellen migrieren *in vitro* dosisabhängig auf rekombinantes Chemerin

Die vorangegangenen Versuche zeigten eine Induktion des Chemokins Chemerin durch R848 in der Leber, welche mit einer erhöhten Infiltration ChemR+ NK-Zellen einherging. Um zu untersuchen, ob NK-Zellen tatsächlich in Richtung eines Chemeringradienten migrieren, führten wir einen *in vitro* Migrationsversuch durch. Das rekombinante Protein Chemerin wurde in drei Verdünnungsschritten in einem Migrations-Assay mit *transwell*-Platte eingesetzt. In die obere Kammer wurden 1 Million Splenozyten aus C57BL/6-Mäusen appliziert. Als Medium wurde ein spezielles nährstoffarmes Medium eingesetzt, da die Proteinkonzentration in Vollmedien das Migrationsverhalten aller Zellen beeinflussen kann. Nach Ende der 4,5-stündigen Migrationszeit wurden die in der unteren Kammer angekommenen Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch gezählt. Es zeigte sich eine dosisabhängige Migration der NK-Zellen auf Chemerin.

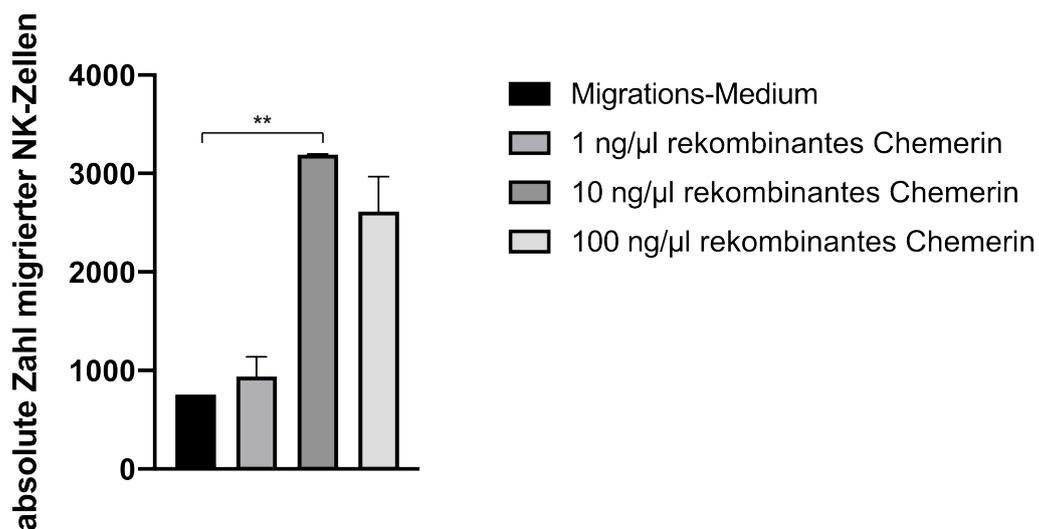


Abbildung 8: Dosisabhängige *in-vitro* Migration der NK-Zellen auf rekombinantes Chemerin

In einer Transwell-Migrations-Platte wurde in der unteren Kammer rekombinantes Chemerin in einem nährstoffarmen Medium in steigender Konzentration aufgetragen. In der oberen Kammer wurden jeweils 1 Million Splenozyten aus Wildtypen-Mäusen appliziert. Nach einer Migrationszeit von 4,5 Stunden wurden die NK-Zellen der unteren Kammer durchflusszytometrisch quantifiziert.

Dargestellt sind die Mittelwerte (n=3 Replikate je Kondition) + SEM; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005. Testart: unverbundener t-Test. Repräsentativ für 3 unabhängige Wiederholungen.

4.2.4 Der Migrationseffekt kann durch Chemerin-*in-vivo*-Depletion aufgehoben werden

Zur *in-vivo*-Validierung wurde ein *Chemerin*-neutralisierender, monoklonaler Antikörper mit dazugehöriger Isotyp-Kontrolle eingesetzt.

Es wurden C57/Bl6 Mäuse in 4 Gruppen aufgeteilt (Tabelle 3). Zwei Gruppen erhielten den Chemerin-Depletionsantikörper und zwei Gruppen den entsprechenden Isotyp in äquivalenter Konzentration. Am nächsten Tag wurde je eine Antikörpergruppe und eine Isotypgruppe mit R848 behandelt, die anderen Gruppen erhielten die Trägerlösung PBS als Kontrolle (Versuchsaufbau siehe Abb. 9).

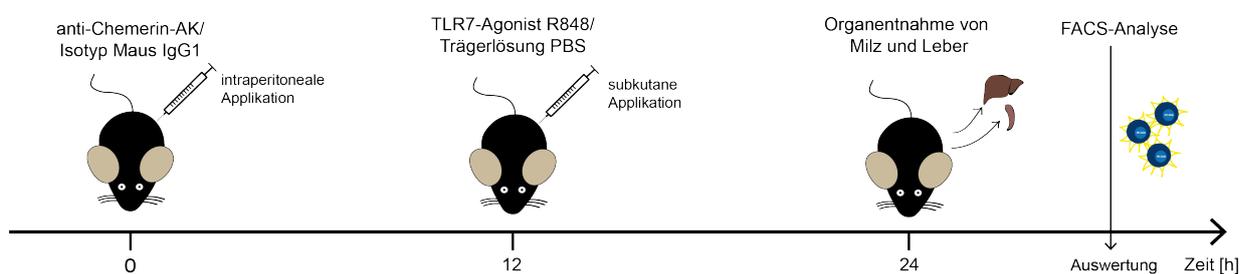


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Zeitachse

Weitere 24 Stunden später wurden Milz und Leber der Mäuse entnommen und die Immunzellen extrahiert. Durchflusszytometrisch wurden sowohl die absoluten Zellzahlen (mit Hilfe von *Counting Beats*) als auch die prozentuale Verteilung der Immunzellen, sowie der Phänotyp bestimmt.

Der Migrationseffekt von NK-Zellen durch R848 aus der Milz in die Leber konnte erneut bestätigt werden (Isotyp Gruppe ohne und mit R848). Durch die Applikation des Chemerin-neutralisierenden Antikörpers wird dieser Effekt fast vollständig aufgehoben (Abb. 10).

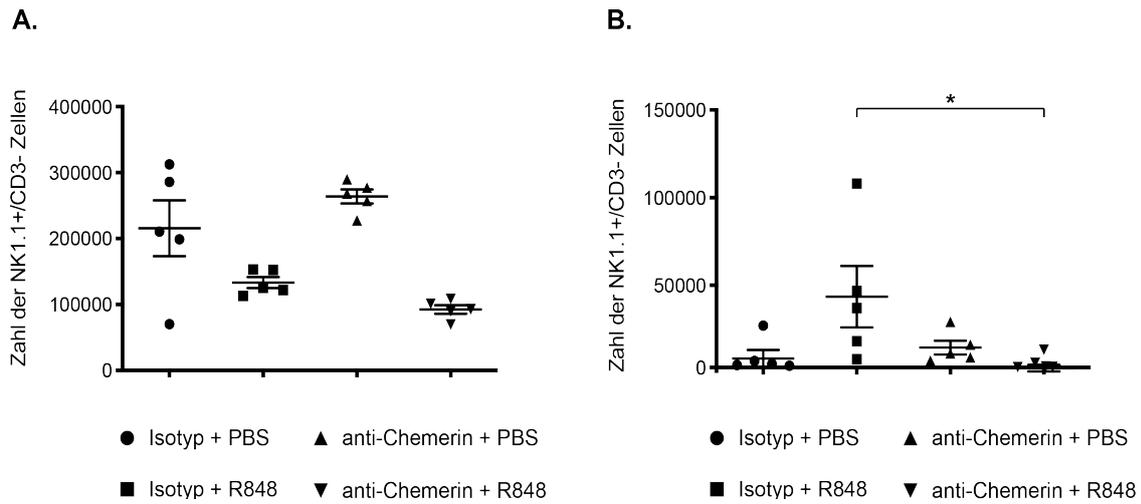


Abbildung 10: Durch Neutralisation des Chemokins Chemerin wurde der Migrationseffekt aktivierter NK-Zellen in die Leber fast vollständig revidiert

In der Milz (A.) zeigte sich das erwartete Verteilungsmuster mit einem Auswandern der NK-Zellen aus der Milz ohne Beeinflussung durch den neutralisierenden Antikörper. Der therapeutische Migrationseffekt in die Leber nach Stimulation mit R848 konnte durch den Chemerin-neutralisierenden Antikörper fast vollständig aufgehoben werden (B.). Der Isotyp Maus-IgG1 diente als Kontroll-Antikörper zum Chemerin-neutralisierenden Antikörper. Die dargestellte Linie zeigt den Mittelwert (n=5 Mäuse pro Gruppe) + SEM. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Individuum. * p < 0,05. Testart: unverbundener t-Test.

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der TLR7-Agonist R848 einen wirksamen Liganden zur Stimulation von NK-Zellen in der systemischen Therapie darstellt. Die systemische Anwendung von R848 führt zu einer vermehrten Sekretion des Adipokins Chemerin aus der Leber. Außer Chemerin wurden nach TLR7-Behandlung auch CXCL9 und CXCL12 in der Leber verstärkt exprimiert. Eine entsprechende Induktion des Chemokin-bindenden Rezeptors CXCR3 konnte aber im Gegensatz zum Chemerin-Liganden CMKLR1 auf NK-Zellen nicht nachgewiesen werden, weshalb eine weitere Untersuchung von CXCL9 und CXCL12 zurückgestellt wurde. Im nächsten Schritt zeigten wir eine Chemerin-abhängige NK-Zell-Migration *in vitro* mit Hilfe eines rekombinant hergestellten Chemerins. Zur Validierung dieser Beobachtung führten wir den Versuch anschließend im Mausmodell durch. Dabei stellten wir fest, dass NK-Zellen ihre Fähigkeit zur Migration in die Leber nach Neutralisation von Chemerin nahezu vollständig verlieren. Trotz einer Stimulation der NK-Zelle mit R848 fand bei fehlendem Chemerin keine Migration in die Leber statt.

Außerdem konnten wir neben einer generalisierten Aktivierung von NK-Zellen zeigen, dass der Chemerin-bindende Rezeptor CMKLR1 hochreguliert wird. Zudem reichern sich insbesondere die CMKLR1-positive NK-Zellen in der Leber an. Dies deutet darauf hin, dass die Induktion von Chemerin in der Leber und die Hochregulierung von CMKLR1 auf aktivierten NK-Zellen ein für die R848-vermittelte Zellmigration notwendiger Mechanismus ist.

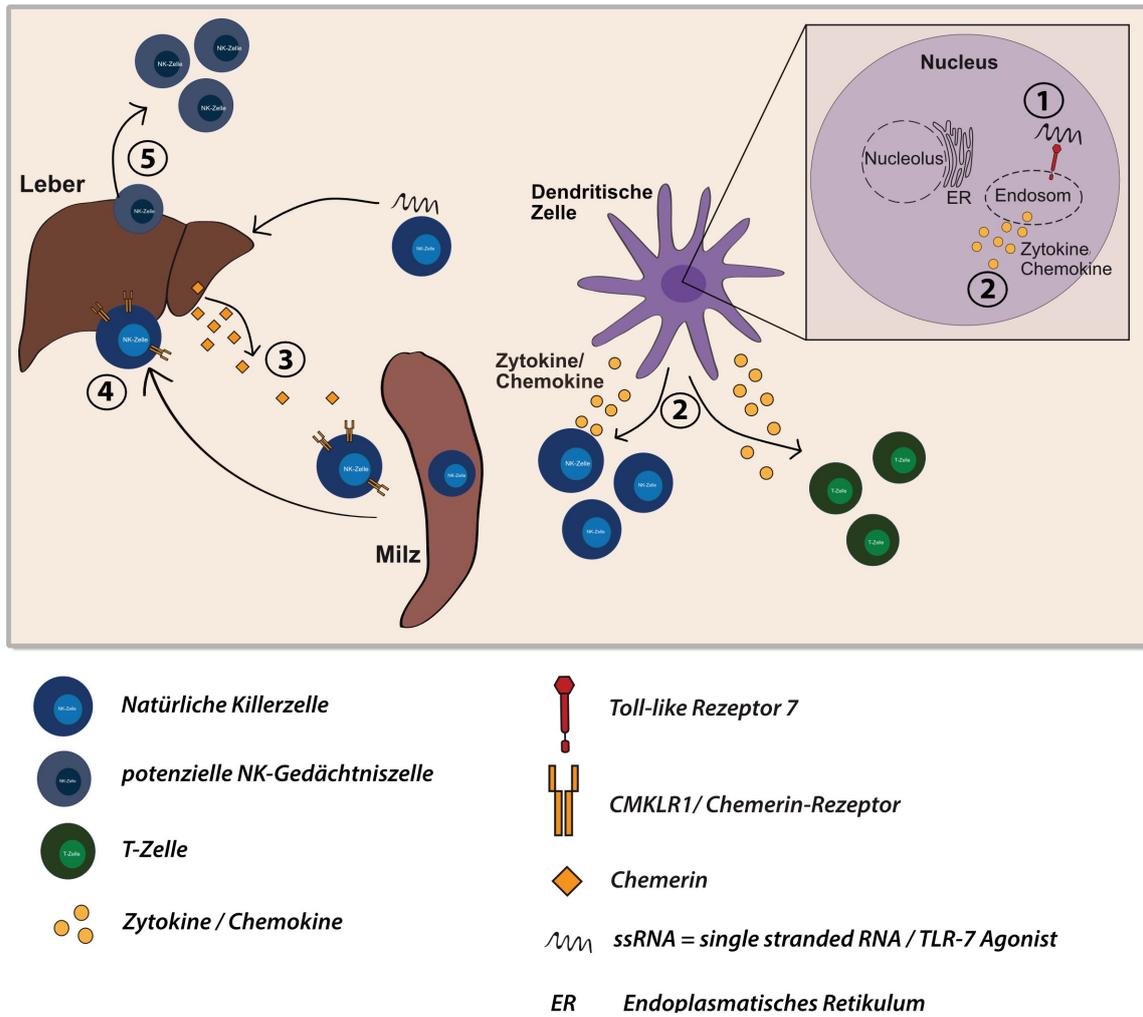


Abbildung 11: Graphische Zusammenfassung der Arbeit

Durch Applikation des TLR-7-Agonisten R848 wird der endosomal liegende TLR7-Rezeptor auf Dendritischen Zellen aktiviert (1)(Hemmi et al. 2002). Die Aktivierung führt zu einer Signalkaskade mit dem Ziel der vermehrten Transkription und Translation proinflammatorische Zytokine und Chemokine (2)(Diebold et al. 2004). Die Sekretion führt zu einer Aktivierung weiterer Immunzellen und zu einer Migration der NK-Zellen aus der Milz in die Leber (4). T-Zellen werden durch den Agonisten aktiviert, ein Einwandern in die Leber findet aber nicht statt. Der NK-Zell-Migration liegt eine gesteigerte Expression des Oberflächenrezeptors CMKLR1 und eine Chemokin-Sekretion der Leber zugrunde (3). Dabei scheint das Chemokin Chemerin obligat für den NK-Zell-Influx in die Leber zu sein. Als Grund für die Zellwanderung in Richtung Leber wird eine Transformation in NK-Gedächtniszellen vermutet, die bei einer erneuten Infektion zu einer schnellen Immunantwort beitragen können (5). (Eigene Abbildung)

5.2 R848 ist ein wirksamer Ligand zur systemischen Aktivierung von NK-Zellen

Seit der ersten Zulassung eines TLR7-Agonisten durch die *FDA* hat der Forschungsbereich an Bedeutung gewonnen. Eine Vielzahl an Agonisten steht als Forschungsreagenz auf dem Markt und findet sich in klinischen Studien (www.clinicaltrials.gov) wieder. Dabei stellt vor allem die systemische Anwendung aufgrund gefürchteter, schwerwiegender Nebenwirkungen die größte Herausforderung dar. In den ersten Studien zählten Fieber, Fatigue und Übelkeit zu den häufigsten Nebenwirkungen, fielen aber zumeist milde aus (Dudek et al. 2007, Dummer et al. 2008). Durch die generalisierte Immunantwort nach Aktivierung der Signalkaskade über die Bindung an den *Toll-like-Rezeptor* sind die Nebenwirkungen am ehesten einer Zytokin-induzierten Inflammation statt einer direkten toxischen Wirkung des Medikamentes zuzuordnen (Savage et al. 1996, Pockros et al. 2007). Die systemische Anwendung könnte aber z.B. im Bereich der Krebsimmuntherapie einen entscheidenden Fortschritt bedeuten. In diesem Zusammenhang wurden lange nur T-Zellen als Haupteffektorzellen untersucht (Huang et al. 2009, Lu et al. 2010). In der Arbeit von Michaelis et. al wird der Effekt des Agonisten R848 den CD8+ T-Zellen zugeschrieben (Michaelis et al. 2019).

Auch bei anderen TLR7-Agonisten wie z.B. MEDI9197 ergaben die Untersuchungen hauptsächlich einen Effekt basierend auf der Infiltration CD8+ T-Zellen (Mullins et al. 2019). Dabei wurde in der Literatur bereits mehrfach auch eine antitumorale NK-Zell-Wirkung über die Aktivierung mittels TLR7-Agonisten beschrieben (Bourquin et al. 2009, Dumitru et al. 2009). In einer Vorarbeit unserer Arbeitsgruppe demonstrierten wir, dass der TLR7-Agonist R848 durch subkutane Injektion und somit systemischer Anwendung in der Lage ist, NK-Zellen aus einem Tumor-abhängigen anergischen Zustand in die physiologische Aktivität zurückzuführen (Wiedemann et al. 2016). Gerade im immunsuppressiven Tumormilieu verlieren NK-Zellen ihre zytotoxische Aktivität und würden von einem Immunmodulator profitieren (Vitale et al. 2014). In der Arbeit von Kim et. al wird der TLR7-Agonist in Nanopartikel verpackt und im Tumormilieu pH-abhängig freigesetzt. Vor Ort führt die Aktivierung zu einer Augmentation der NK-Zell-vermittelten antitumoralen Immunantwort (Kim et al. 2020). Wie in der Arbeit von Mullins et al. gezeigt werden konnte, hilft auch eine intratumorale Applikation, um eine anti-tumorale Aktivität der körpereigenen Immunzellen zu erreichen und kann sogar durch eine Kombination mit anderen Immunmodulatoren oder Checkpoint-Inhibitoren noch verstärkt werden (Mullins et al. 2019).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass der TLR7-Agonist R848 bei systemischer Anwendung einen potenten Liganden zur Aktivierung von NK-Zellen darstellt. Nach subkutaner Applikation konnte auf nahezu allen NK-Zellen eine Induktion des Aktivierungsmarkers CD69 nachgewiesen werden. Auch NKG2D, welcher auf NK-Zellen zusätzlich die zytotoxische Funktion der Zelle induzieren kann (Jamieson et al. 2002), wird nach R848-Behandlung verstärkt exprimiert. Im Hinblick auf Bestrebungen der gezielteren Tumorthherapie kann die Kenntnis darüber helfen, aktivierte NK-Zellen im therapeutischen Rahmen zur Migration in Richtung des Tumors anzuregen.

5.3 R848-aktivierte NK-Zellen wandern gezielt aus der Milz in die Leber

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Migration von aktivierten NK-Zellen aus der Milz in die Leber gezeigt werden. Dass NK-Zellen in die Leber einwandern ist keine neue Erkenntnis, sondern konnte bereits in der Arbeit von Salazar-Mather et al. bereits gezeigt werden (Salazar-Mather et al. 1998). In den Untersuchungen der Arbeitsgruppe wurde die NK-Zellmigration im Rahmen einer Zytomegalievirus (CMV)-Infektion beschrieben. Wie auch durch die Stimulation mittels eines TLR7-Agonisten handelt es sich bei einer CMV-Infektion um eine Virus-getriggerte NK-Zellaktivierung nach Induktion des TLR7-Signalweges (Dokun et al. 2001, Nguyen et al. 2002). Die genaue Funktion der aktivierten NK-Zellen in der Leber bleibt bislang unklar. Eine Möglichkeit, welche in der Literatur diskutiert wird, ist die Ausbildung von NK-Gedächtniszellen (Jiang et al. 2013). Bei den Untersuchungen einer NK-Zell-Gedächtnisfunktion konnte eine Anreicherung der potenziellen Gedächtniszellen in der Leber beobachtet werden (Peng et al. 2013). Man nimmt an, dass es sich dabei um eine Parallele zu den ausgebildeten T-Gedächtniszellen handelt, welche nach Differenzierung in das Knochenmark einwandern und in einer Art Ruhezustand verharren (Mazo et al. 2005, Tokoyoda et al. 2009). Analog dazu konnte in dieser Arbeit keine Migration von aktivierten T-Zellen nach Stimulation mit R848 in die Leber beobachtet werden.

Bei der Ausbildung potenzieller NK-Gedächtniszellen in der Leber werden zwei Hypothesen diskutiert (Neely et al. 2018). Einerseits, dass es sich um eine Phänotypänderung der bereits Gewebe-ständigen NK-Zellen handelt, andererseits, dass spezifische NK-Zell-Subpopulationen zur Ausdifferenzierung in die Leber rekrutiert werden (Jiang et al. 2012, Spits et al. 2016, Stegmann et al. 2016). In Bezug darauf wurden die in dieser Arbeit die stimulierten und migrierten Zellen aus Leber und Milz untersucht. Dabei zeigte sich eine erhöhte CCR5-Expression der migrierten NK-

Zellen in der Leber. Die bisherigen Untersuchungen von Leber-residenten NK-Zellen zeigten ebenfalls eine erhöhte CCR5-Expression im Vergleich zu zirkulierenden NK-Zellen (Hudspeth et al. 2016). Im Gegensatz zur Literatur konnten wir keine erhöhte Expression von CXCR6 auf den NK-Zellen der Leber feststellen (Geissmann et al. 2005). Eine Möglichkeit wäre, dass die kombinierte Expression von CCR5 und CXCR6 Ausdruck von Leber-residenten Zellen ist und eine eigene Subpopulation beschreibt, während es sich in diesen Untersuchungen um aktivierte und in die Leber migrierte NK-Zellen aus der Milz handelt (Paust et al. 2010, Stegmann et al. 2016).

Eine erhöhte CCR5-Expression spielt außerdem im Rahmen entzündlicher Lebererkrankung wie der Hepatitis oder dem akuten Leberversagen eine wichtige Rolle (Stevens et al. 2019). Hier erfolgt gemeinsam mit CCR2 eine weitere Lymphozytenrekrutierung zur Progression der inflammatorischen Reaktion (Puengel et al. 2017). Zur Überprüfung der Relevanz von CCR5 auf das Migrationsverhalten wären weitere Untersuchungen mit einer Blockade des Rezeptors, z.B. durch das HIV-Medikament Maraviroc, interessant.

5.4 Chemokin-Induktion in der Leber nach systemischer R848-Anwendung

5.4.1 Systemische R848-Anwendung führt zu einer Chemerin-Induktion in der Leber

Die Analyse der Leber aus R848-therapierten Mäusen ergab eine signifikant erhöhte Chemerin Konzentration im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass die Leber zu den primären, Chemerin-produzierenden Organen gehört (Fatima et al. 2014). Chemerin ist ein multifunktionales Chemokin, welches hauptsächlich von Fettzellen produziert wird und somit zur Gruppe der Adipokine zählt (Goralski et al. 2007, Mattern et al. 2014). Die Versuche im Rahmen dieser Arbeit zum Nachweis des spezifischen Chemerin-produzierenden Zelltyps in der Leber ergaben keine verwertbaren Resultate. Chemerin wurde in den bisherigen Untersuchungen vorwiegend im Rahmen eines metabolischen Syndroms und damit verbundenen Sekundärerkrankungen beschrieben (Bozaoglu et al. 2007, Ba et al. 2019). Ein bekannter Stimulus zur Sekretion von Chemerin ist in diesem Zusammenhang Insulin (Bauer et al. 2012). Diskutiert wird auch die Rolle des *sterol regulatory element binding transcription factor 2* (SREBP2), über dessen Aktivierung Chemerin induziert werden kann (Bauer et al. 2011). Eine Induktion über einen TLR-Agonisten ist nach heutigem Kenntnisstand nicht bekannt. Hingegen wird eine

Induktion des Chemerin-bindenden Rezeptors *Chemokine-like receptor-1* (CMKLR1) auf Makrophagen in der Arbeit von Zabel et. al beobachtet (Zabel et al. 2006). In jüngster Vergangenheit wird zunehmend die Rolle von Chemerin bei inflammatorischen Erkrankungen und Tumoren untersucht (Goralski et al. 2019, Treeck et al. 2019). Dabei wird dem Chemokin eine immunomodulatorische Rolle zugeschrieben und kann je nach Kontext pro- und antiinflammatorische Wirkungen aufweisen (Dimitriadis et al. 2018, Jaworek et al. 2019). Das Chemokin wird als inaktives Protein in die Blutbahn sezerniert und mit Hilfe ubiquitär vorkommender Proteasen durch Spaltung des C-Terminus in die aktive Form umgewandelt (Zabel et al. 2005). In der aktiven Form wird vor allem eine NFκB-abhängige antiinflammatorische Wirkung von Chemerin beschrieben (Dranse et al. 2016). Bei Patienten mit einem Hepatozellulären Karzinom (HCC) oder auch im HCC-Mausmodell wurden geringere Chemerinlevel der Leber im Vergleich zu Gesunden gemessen (Lin et al. 2017). In der Arbeit von Lin et al. konnte außerdem gezeigt werden, dass eine lokale Erhöhung der Chemerinkonzentration in der Leber zu einer Hemmung des Tumorwachstums führte. Vermutet wird auch hier die bivalente Funktion einerseits durch eine Infiltration von Tumorsuppressorzellen und andererseits durch eine Inhibition inflammatorischer Zytokine wie IL6. Insgesamt wird dadurch eine Chemerin-abhängige Änderung des Tumormilieus erreicht. Der TLR7-Agonist R848 könnte in diesem Zusammenhang die anti-tumorale Wirkung von Chemerin unterstützen.

5.4.2 Induktion weiterer Chemokine in der Leber nicht wegweisend

Neben Chemerin konnte in der Analyse der Leber außerdem eine signifikante Induktion weiterer Zytokine beobachtet werden. CCL2 wurde beispielsweise nach TLR7-Stimulation in der Leber vermehrt nachgewiesen. Eine induzierte CCL2-Sekretion ist bereits in Relation mit einer entzündlichen Lebererkrankung beschrieben und führt zu einer Migrationsbewegung von Makrophagen in Richtung Leber (Marra et al. 2014). Die Arbeit von Teng et. al suggeriert aber im Gegensatz zu den uns vorliegenden Resultaten eine erhöhte Infiltration von NK-Zellen in die Leber nach Neutralisation von CCL2 (Teng et al. 2017).

Die Chemokin-Achsen CXCL12-CXCR4 und CXCL9-CXCR3 sind in der Literatur im Zusammenhang mit einer chronischen Hepatitis, der Entwicklung eines HCC und Metastasenbildung in der Leber beschrieben (Arsent'eva et al. 2015, Chalin et al. 2019). Dabei korreliert jeweils eine erhöhte Chemokinkonzentration mit einer schlechten Prognose der Erkrankung (Elshaer et al. 2019, Miyata et al. 2019).

Carrière et. al beschreiben ein Einwandern von Neutrophilen Granulozyten durch Überexpression mehrerer Chemokine, unter anderem CCL6 (Carrière et al. 2017). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die systemische Therapie mit R848 zu einer Induktion mehrerer Chemokine in der Leber führt. Bezugnehmend auf die Migration von NK-Zellen in die Leber, zeigte jedoch lediglich der Chemerin-bindende Rezeptor äquivalent eine gesteigerte Expression auf NK-Zellen. Eine weitere Investigation der überexprimierten Chemokine wurde daher nicht durchgeführt und müsste daher Gegenstand weiterer Untersuchungen werden.

5.5 Gezielte Migration R848-aktivierter NK-Zellen auf Chemerin

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass nach Behandlung mit einem TLR7-Agonisten eine gezielte NK-Zell-Migration auf Chemerin stattfindet. Paroli et. al und Skrzeczynska-Moncznik et. al zeigten in ihren Untersuchungen bereits die Migration von NK-Zellen und DCs auf Chemerin in entzündetes Gewebe (Parolini et al. 2007, Skrzeczyńska-Moncznik et al. 2009). Durch die Stimulation mit R848 wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, was zu einer Erhöhung der Chemerin-Konzentration und folglich der Migration von NK-Zellen entlang des Konzentrationsgradienten führt. Diese Hypothese passt zum aktuellen Kenntnisstand, dass Chemerin in der Rekrutierung weiterer Immunzellen, insbesondere NK-Zellen, MDSCs und pDCs, eine wichtige Rolle spielt (Wittamer et al. 2005, Luangsay et al. 2009).

Chemerin wird von den G-Protein gekoppelten Rezeptoren CMKLR1 und *G-Protein coupled receptor 1* (GPR1) gebunden (Mattern et al. 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen, dass CMKLR1 in seiner Funktion hauptsächlich für die Migration auf Chemerin verantwortlich ist. *C-C chemokine receptor like-2* (CCRL2) ist ein weiterer Chemerin-bindender Rezeptor, über dessen Bindung eine lokale Konzentrationserhöhung und eine Präsentation von Chemerin für andere Zellen erreicht wird (Monnier et al. 2012). Eine weitere Untersuchung von CCRL2 und GPR1 auf Immunzellen der Leber nach R848-Behandlung könnte zu einem besseren Verständnis der Migrationsbewegung in Richtung Chemerin führen.

Die gezielte Rekrutierung von Immunzellen durch Chemerin wurde auch im Rahmen von Tumorerkrankung untersucht. Pachynski et. al konnten z.B. ein verlangsamtes Tumorwachstum im Melanom-Modell durch intratumorale Chemerin-Injektion feststellen (Pachynski et al. 2012).

Die Erkenntnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine weitere Untersuchung der systemischen Anwendung eines TLR7-Agonisten sinnvoll ist. Dabei könnte die durch

R848 getriggerte Chemerininduktion helfen, aktivierte NK-Zellen zum Ort des Tumors zu rekrutieren.

5.6 Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Migrationsverhaltens und eine Charakterisierung der NK-Zellen nach Stimulation mit einem TLR7-Agonisten, um Erkenntnisse über die Folgen einer systemischen Anwendung des Medikaments zu erlangen. Bei der aktuell zugelassenen topischen Anwendung sind wenige unerwünschte Reaktionen bei guter Wirksamkeit beschrieben (Meyer et al. 2013). Um eine systemische Anwendung zu antitumoralen und immunmodulatorischen Zwecken zu ermöglichen, bedarf es einer ausführlichen Analyse der Wirkung auf die Immunzellen. Damit soll das Risiko einer gegebenenfalls überschießenden Immunantwort besser eingeschätzt werden und das Spektrum an behandlungslimitierenden Nebenwirkungen eruiert werden. In dieser Arbeit wurden erste Erkenntnisse über die wichtigsten Effektorzellen und die genauere Wirkungsweise des TLR7-Agonisten gewonnen.

Es konnte gezeigt werden, dass das Medikament eine ausgesprochen gute, aktivierende Wirkung auf die Zellen der angeborenen Immunabwehr besitzt. Das verhältnismäßig wenig untersuchte Chemokin *Chemerin* konnte zudem als Protein zur Migration von aktivierten NK-Zellen identifiziert werden. Erstmals ist eine Migration von NK-Zellen nach Therapie mit einem TLR7-Agonisten auf Chemerin beschrieben worden.

6. Zusammenfassung

Die Immuntherapie von Tumoren gewinnt seit Jahren zunehmend an Bedeutung, weshalb verschiedene Möglichkeiten der Aktivierung der eigenen Immunantwort untersucht werden. Verfahren zur Mobilisierung der adaptiven Immunantwort (z.B. Antikörper-Therapie) sind bereits etabliert. Aktuell weniger genutzt ist der Ansatz über eine Aktivierung der angeborenen Immunität mit Hilfe eines *Toll-like*-Rezeptor-(TLR-) Agonisten. Aufgrund wirkungslimitierender Toxizitäten von TLR-Liganden bei systemischer Anwendung ist bisher nur eine topische Applikation zugelassen. Für eine systemische Anwendung sind weitere Untersuchungen des Mechanismus von großer Bedeutung. In Vorversuchen zeigte sich bereits eine NK-Zellmigration aus der Milz in die Leber bei Anwendung eines TLR7-Agonisten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des TLR7-Agonisten auf die NK-Zell-Migration, vor allem in der Leber. Die Leber wurde zunächst auf Veränderungen nach Stimulation mit Resiquimod (R848) untersucht. Das Chemokin Chemerin zeigte die größte Induktion in der Leber nach R848-Behandlung. Daneben wurden CXCL9 und CXCL12 stärker exprimiert. Im nächsten Schritt wurde der Chemokin-bindende Rezeptor auf der Zelloberfläche von NK-Zellen untersucht. Durchflusszytometrisch konnte eine erhöhte Expression des Chemerin-bindenden Rezeptors CMKLR1 auf NK-Zellen der Leber in behandelten Mäusen gezeigt werden. Zur Verifizierung der chemotaktischen Wirkung Chemerins auf NK-Zellen wurde die Migration *in vitro* mit einer rekombinant hergestellten Form des Chemokins getestet. Es zeigte sich eine dosisabhängige Migration der NK-Zellen in Richtung eines Chemeringradienten. Somit scheint Chemerin das ausschlaggebende Chemokin für das Auswandern von NK-Zellen aus der Milz in die Leber nach R848-Therapie zu sein. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurde ein Chemerin-neutralisierender Antikörper Mäusen *in vivo* appliziert und die Tiere wurden anschließend mit R848 (oder PBS als Kontrolle) therapiert. In der R848-behandelten Gruppe, die zusätzliche den Chemerin-neutralisierenden Antikörper erhielt, war der zuvor beobachtete Effekt fast vollständig aufgehoben. Zwar wanderten aktivierte NK-Zellen immernoch aus der Milz aus, bei Fehlen von Chemerin fand jedoch kein Influx der Zellen in die Leber statt.

Zusammenfassend konnten wir mit dieser Arbeit den TLR7-Agonisten R848 als potenten Liganden zur Aktivierung von NK-Zellen bestätigen. Durch die systemische Anwendung wird Chemerin in der Leber induziert. Erstmals konnten wir in diesem

Zusammenhang eine Chemerin-abhängige NK-Zellmigration in die Leber nach Behandlung mit einem TLR7-Agonisten nachweisen. Diese Erkenntnisse haben Relevanz für die Entwicklung neuer NK-Zell-gerichteter Therapieansätze, z.B. in der Tumorthherapie.

7. Literaturverzeichnis

- Agrawal, S. and M. C. Kishore. "MHC class I gene expression and regulation." *J Hematother Stem Cell Res* (2000) 9(6): 795-812.
- Allan, R. S., C. M. Smith, G. T. Belz, A. L. van Lint, L. M. Wakim, W. R. Heath and F. R. Carbone. "Epidermal viral immunity induced by CD8alpha+ dendritic cells but not by Langerhans cells." *Science* (2003) 301(5641): 1925-8.
- Anderson, M. J. "The role of interferon in the NK cell killing of virus-infected target cells." *J Hyg (Lond)* (1982) 89(2): 347-51.
- Apanius, V., D. Penn, P. R. Slev, L. R. Ruff and W. K. Potts. "The nature of selection on the major histocompatibility complex." *Crit Rev Immunol* (1997) 17(2): 179-224.
- Applequist, S. E., R. P. Wallin and H. G. Ljunggren. "Variable expression of Toll-like receptor in murine innate and adaptive immune cell lines." *Int Immunol* (2002) 14(9): 1065-74.
- Arits, A. H., K. Mosterd, B. A. Essers, E. Spooenberg, A. Sommer, M. J. De Rooij, H. P. van Pelt, P. J. Quaedvlieg, G. A. Krekels, P. A. van Neer, J. J. Rijzewijk, A. J. van Geest, P. M. Steijlen, P. J. Nelemans and N. W. Kelleners-Smeets. "Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma: a single blind, non-inferiority, randomised controlled trial." *Lancet Oncol* (2013) 14(7): 647-54.
- Arsent'eva, N. A., A. V. Semenov, N. E. Lyubimova, Y. V. Ostankov, D. S. Elezo, I. V. Kudryavtsev, V. V. Basina, E. V. Esaulenko, K. V. Kozlov, K. V. Zhdanov and A. A. Totolyan. "Chemokine receptors CXCR3 and CCR6 and their ligands in the liver and blood of patients with chronic hepatitis C." *Bull Exp Biol Med* (2015) 160(2): 252-5.
- Artis, D. and H. Spits. "The biology of innate lymphoid cells." *Nature* (2015) 517(7534): 293-301.
- Ba, H. J., L. L. Xu, Y. Z. Qin and H. S. Chen. "Serum chemerin levels correlate with determinants of metabolic syndrome in obese children and adolescents." *Clin Med Insights Pediatr* (2019) 13: 1179556519853780.
- Babić, M., M. Pyzik, B. Zafirova, M. Mitrović, V. Butorac, L. L. Lanier, A. Krmpotić, S. M. Vidal and S. Jonjić. "Cytomegalovirus immunoevasin reveals the physiological role of "missing self" recognition in natural killer cell dependent virus control in vivo." *J Exp Med* (2010) 207(12): 2663-73.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman. "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* (1998) 392(6673): 245-52.
- Bauer, S., M. Bala, A. Kopp, K. Eisinger, A. Schmid, S. Schneider, M. Neumeier and C. Buechler. "Adipocyte chemerin release is induced by insulin without being translated to higher levels in vivo."

Eur J Clin Invest (2012) 42(11): 1213-20.

Bauer, S., J. Wanninger, S. Schmidhofer, J. Weigert, M. Neumeier, C. Dorn, C. Hellerbrand, N. Zimara, A. Schäffler, C. Aslanidis and C. Buechler. "Sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) activation after excess triglyceride storage induces chemerin in hypertrophic adipocytes."
Endocrinology (2011) 152(1): 26-35.

Blom, K. G., M. R. Qazi, J. B. Matos, B. D. Nelson, J. W. DePierre and M. Abedi-Valugerdi. "Isolation of murine intrahepatic immune cells employing a modified procedure for mechanical disruption and functional characterization of the B, T and natural killer T cells obtained."
Clin Exp Immunol (2009) 155(2): 320-9.

Bourquin, C., L. Schmidt, A. L. Lanz, B. Storch, C. Wurzenberger, D. Anz, N. Sandholzer, R. Mocikat, M. Berger, H. Poeck, G. Hartmann, V. Hornung and S. Endres. "Immunostimulatory RNA oligonucleotides induce an effective antitumoral NK cell response through the TLR7."
J Immunol (2009) 183(10): 6078-86.

Bozaoglu, K., K. Bolton, J. McMillan, P. Zimmet, J. Jowett, G. Collier, K. Walder and D. Segal. "Chemerin is a novel adipokine associated with obesity and metabolic syndrome."
Endocrinology (2007) 148(10): 4687-94.

Brown, C. R. and R. McLeod. "Class I MHC genes and CD8+ T cells determine cyst number in *Toxoplasma gondii* infection."
J Immunol (1990) 145(10): 3438-41.

Carrière, V., M. I. Arshad, J. Le Seyec, B. Lefevre, M. Farooq, A. Jan, C. Manuel, L. Touami-Bernard, C. Lucas-Clerc, V. Genet, H. Gascan, J. P. Girard, F. Chalmel, L. Lamontagne, C. Piquet-Pellorce and M. Samson. "Endogenous IL-33 deficiency exacerbates liver injury and increases hepatic influx of neutrophils in acute murine viral Hepatitis."
Mediators Inflamm (2017) 2017: 1359064.

Cella, M., D. Jarrossay, F. Facchetti, O. Alebardi, H. Nakajima, A. Lanzavecchia and M. Colonna. "Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon."
Nat Med (1999) 5(8): 919-23.

Cerwenka, A. and L. L. Lanier. "Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer."
Nat Rev Immunol (2016) 16(2): 112-23.

Chalin, A., B. Lefevre, C. Devisme, N. Barget, L. Amiot and M. Samson. "Circulating levels of CXCL11 and CXCL12 are biomarkers of cirrhosis in patients with chronic hepatitis C infection."
Cytokine (2019) 117: 72-78.

Chen, L. and D. B. Flies. "Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition."
Nat Rev Immunol (2013) 13(4): 227-42.

- Chitwood, K., J. Etzkorn and G. Cohen. "Topical and intralesional treatment of nonmelanoma skin cancer: efficacy and cost comparisons." *Dermatol Surg* (2013) 39(9): 1306-16.
- Choudhuri, K., D. Wiseman, M. H. Brown, K. Gould and P. A. van der Merwe. "T-cell receptor triggering is critically dependent on the dimensions of its peptide-MHC ligand." *Nature* (2005) 436(7050): 578-82.
- Collin, M., N. McGovern and M. Haniffa. "Human dendritic cell subsets." *Immunology* (2013) 140(1): 22-30.
- Conroy, H., N. A. Marshall and K. H. Mills. "TLR ligand suppression or enhancement of Treg cells? A double-edged sword in immunity to tumours." *Oncogene* (2008) 27(2): 168-80.
- Cooper, M. A., J. M. Elliott, P. A. Keyel, L. Yang, J. A. Carrero and W. M. Yokoyama. "Cytokine-induced memory-like natural killer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* (2009) 106(6): 1915-9.
- Cruz-Muñoz, M. E., L. Valenzuela-Vázquez, J. Sánchez-Herrera and J. Santa-Olalla Tapia. "From the "missing self" hypothesis to adaptive NK cells: Insights of NK cell-mediated effector functions in immune surveillance." *J Leukoc Biol* (2019) 105(5): 955-971.
- Davis, Z. B., M. Felices, M. R. Verneris and J. S. Miller. "Natural killer cell adoptive transfer therapy: exploiting the first line of defense against cancer." *Cancer J* (2015) 21(6): 486-91.
- de Vries, J. E., H. Yssel and H. Spits. "Interplay between the TCR/CD3 complex and CD4 or CD8 in the activation of cytotoxic T lymphocytes." *Immunol Rev* (1989) 109: 119-41.
- Diebold, S. S., T. Kaisho, H. Hemmi, S. Akira and C. Reis e Sousa. "Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA." *Science* (2004) 303(5663): 1529-31.
- Dimitriadis, G. K., J. Kaur, R. Adya, A. D. Miras, H. S. Mattu, J. G. Hattersley, G. Kaltsas, B. K. Tan and H. S. Randeve. "Chemerin induces endothelial cell inflammation: activation of nuclear factor-kappa beta and monocyte-endothelial adhesion." *Oncotarget* (2018) 9(24): 16678-16690.
- Dockrell, D. H. and G. R. Kinghorn. "Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators." *J Antimicrob Chemother* (2001) 48(6): 751-5.
- Dokun, A. O., S. Kim, H. R. Smith, H. S. Kang, D. T. Chu and W. M. Yokoyama. "Specific and nonspecific NK cell activation during virus infection." *Nat Immunol* (2001) 2(10): 951-6.
- Dranse, H. J., S. Muruganandan, J. P. Fawcett and C. J. Sinal. "Adipocyte-secreted chemerin is processed to a variety of isoforms and influences MMP3 and chemokine secretion through an NFkB-dependent mechanism." *Mol Cell Endocrinol* (2016) 436: 114-29.

- Dudek, A. Z., C. Yunis, L. I. Harrison, S. Kumar, R. Hawkinson, S. Cooley, J. P. Vasilakos, K. S. Gorski and J. S. Miller. "First in human phase I trial of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced cancer."
Clin Cancer Res (2007) 13(23): 7119-25.
- Dumitru, C. D., M. A. Antonysamy, K. S. Gorski, D. D. Johnson, L. G. Reddy, J. L. Lutterman, M. M. Piri, J. Proksch, S. M. McGurran, E. A. Egging, F. R. Cochran, K. E. Lipson, M. A. Tomai and G. W. Gullikson. "NK1.1+ cells mediate the antitumor effects of a dual Toll-like receptor 7/8 agonist in the disseminated B16-F10 melanoma model."
Cancer Immunol Immunother (2009) 58(4): 575-87.
- Dummer, R., A. Hauschild, J. C. Becker, J. J. Grob, D. Schadendorf, V. Tebbs, J. Skalsky, K. C. Kaehler, S. Moosbauer, R. Clark, T. C. Meng and M. Urosevic. "An exploratory study of systemic administration of the toll-like receptor-7 agonist 852A in patients with refractory metastatic melanoma."
Clin Cancer Res (2008) 14(3): 856-64.
- Dyck, L. and K. H. G. Mills. "Immune checkpoints and their inhibition in cancer and infectious diseases."
Eur J Immunol (2017) 47(5): 765-779.
- Elshaer, A. M., O. A. El-Kharashi, G. G. Hamam, E. S. Nabih, Y. M. Magdy and A. A. Abd El Samad. "Involvement of TLR4/ CXCL9/ PREX-2 pathway in the development of hepatocellular carcinoma (HCC) and the promising role of early administration of lactobacillus plantarum in Wistar rats."
Tissue Cell (2019) 60: 38-47.
- Engelhardt, R., A. Mackensen and C. Galanos. "Phase I trial of intravenously administered endotoxin (*Salmonella abortus equi*) in cancer patients."
Cancer Res (1991) 51(10): 2524-30.
- Ezekowitz, R. A. B. and J. A. Hoffmann. "Innate immunity."
Curr Opin Immunol (1996) 8(1): 1-2.
- Fatima, S. S., R. Rehman, M. Baig and T. A. Khan. "New roles of the multidimensional adipokine: chemerin."
Peptides (2014) 62: 15-20.
- Gardiner, C. M. "Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why."
Int J Immunogenet (2008) 35(1): 1-8.
- Geissmann, F., T. O. Cameron, S. Sidobre, N. Manlongat, M. Kronenberg, M. J. Briskin, M. L. Dustin and D. R. Littman. "Intravascular immune surveillance by CXCR6+ NKT cells patrolling liver sinusoids."
PLoS Biol (2005) 3(4): e113.
- Goralski, K. B., A. E. Jackson, B. T. McKeown and C. J. Sinal. "More Than an Adipokine: The complex roles of chemerin signaling in cancer."
Int J Mol Sci (2019) 20(19).

- Goralski, K. B., T. C. McCarthy, E. A. Hanniman, B. A. Zabel, E. C. Butcher, S. D. Parlee, S. Muruganandan and C. J. Sinal. "Chemerin, a novel adipokine that regulates adipogenesis and adipocyte metabolism."
J Biol Chem (2007) 282(38): 28175-88.
- Hallam, S., M. Escorcio-Correia, R. Soper, A. Schultheiss and T. Hagemann. "Activated macrophages in the tumour microenvironment-dancing to the tune of TLR and NF-kappaB."
J Pathol (2009) 219(2): 143-52.
- Hart, O. M., V. Athie-Morales, G. M. O'Connor and C. M. Gardiner. "TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production."
J Immunol (2005) 175(3): 1636-42.
- Hasenkamp, J., A. Borgerding, M. Uhrberg, C. Falk, B. Chapuy, G. Wulf, W. Jung, L. Trümper and B. Glass. "Self-tolerance of human natural killer cells lacking self-HLA-specific inhibitory receptors."
Scand J Immunol (2008) 67(3): 218-29.
- Hemmi, H., T. Kaisho, O. Takeuchi, S. Sato, H. Sanjo, K. Hoshino, T. Horiuchi, H. Tomizawa, K. Takeda and S. Akira. "Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway."
Nat Immunol (2002) 3(2): 196-200.
- Hornung, V., M. Guenther-Biller, C. Bourquin, A. Ablasser, M. Schlee, S. Uematsu, A. Noronha, M. Manoharan, S. Akira, A. de Fougerolles, S. Endres and G. Hartmann. "Sequence-specific potent induction of IFN-alpha by short interfering RNA in plasmacytoid dendritic cells through TLR7."
Nat Med (2005) 11(3): 263-70.
- Hu, Y., Z. G. Tian and C. Zhang. "Chimeric antigen receptor (CAR)-transduced natural killer cells in tumor immunotherapy."
Acta Pharmacol Sin (2018) 39(2): 167-176.
- Huang, S. J., D. Hijnen, G. F. Murphy, T. S. Kupper, A. W. Calarese, I. G. Mollet, C. F. Schanbacher, D. M. Miller, C. D. Schmults and R. A. Clark. "Imiquimod enhances IFN-gamma production and effector function of T cells infiltrating human squamous cell carcinomas of the skin."
J Invest Dermatol (2009) 129(11): 2676-85.
- Hudspeth, K., M. Donadon, M. Cimino, E. Pontarini, P. Tentorio, M. Preti, M. Hong, A. Bertoletti, S. Bicciato, P. Invernizzi, E. Lugli, G. Torzilli, M. E. Gershwin and D. Mavilio. "Human liver-resident CD56(bright)/CD16(neg) NK cells are retained within hepatic sinusoids via the engagement of CCR5 and CXCR6 pathways."
J Autoimmun (2016) 66: 40-50.
- Iwasaki, A. and R. Medzhitov. "Control of adaptive immunity by the innate immune system."
Nat Immunol (2015) 16(4): 343-53.
- Jamieson, A. M., A. Diefenbach, C. W. McMahon, N. Xiong, J. R. Carlyle and D. H. Raulet. "The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing."

Immunity (2002) 17(1): 19-29.

Janeway, C. J. T., P; Walport, M et al. (2001). The major histocompatibility complex and its functions. Immunobiology: The immune system in health and disease. New York, Garland Science. 5th edition.

Jaworek, J., J. Szklarczyk, M. Kot, M. Góralaska, A. Jaworek, J. Bonior, A. Leja-Szpak, K. Nawrot-Porąbka, P. Link-Lenczowski, P. Ceranowicz, K. Galazka, Z. Warzecha, A. Dembinski and P. Pierzchalski. "Chemerin alleviates acute pancreatitis in the rat thorough modulation of NF- κ B signal." *Pancreatology* (2019) 19(3): 401-408.

Jiang, X., Y. Chen, H. Peng and Z. Tian. "Memory NK cells: why do they reside in the liver?" *Cell Mol Immunol* (2013) 10(3): 196-201.

Jiang, X., Y. Chen, H. Peng and Z. Tian. "Single line or parallel lines: NK cell differentiation driven by T-bet and Eomes." *Cell Mol Immunol* (2012) 9(3): 193-4.

Kiessling, R., E. Klein and H. Wigzell. "'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* (1975) 5(2): 112-7.

Kim, H., V. Khanna, T. A. Kucaba, W. Zhang, D. Sehgal, D. M. Ferguson, T. S. Griffith and J. Panyam. "TLR7/8 Agonist-loaded nanoparticles augment NK cell-mediated antibody-based cancer immunotherapy." *Mol Pharm* (2020) 17(6): 2109-2124.

Knight, S. C. and A. J. Stagg. "Antigen-presenting cell types." *Curr Opin Immunol* (1993) 5(3): 374-82.

Kobold, S., G. Wiedemann, S. Rothenfußer and S. Endres. "Modes of action of TLR7 agonists in cancer therapy." *Immunotherapy* (2014) 6(10): 1085-95.

Koene, H. R., M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A. E. von dem Borne and M. de Haas. "Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype." *Blood* (1997) 90(3): 1109-14.

Kotsias, F., I. Cebrian and A. Alloatti. "Antigen processing and presentation." *Int Rev Cell Mol Biol* (2019) 348: 69-121.

Lee, P. P., C. Yee, P. A. Savage, L. Fong, D. Brockstedt, J. S. Weber, D. Johnson, S. Swetter, J. Thompson, P. D. Greenberg, M. Roederer and M. M. Davis. "Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients." *Nat Med* (1999) 5(6): 677-85.

Li, Q. J., A. R. Dinner, S. Qi, D. J. Irvine, J. B. Huppa, M. M. Davis and A. K. Chakraborty. "CD4 enhances T cell sensitivity to antigen by coordinating Lck accumulation at the immunological synapse."

Nat Immunol (2004) 5(8): 791-9.

Lim, W. A. and C. H. June. "The Principles of Engineering Immune Cells to Treat Cancer."

Cell (2017) 168(4): 724-740.

Lin, Y., X. Yang, W. Liu, B. Li, W. Yin, Y. Shi and R. He. "Chemerin has a protective role in hepatocellular carcinoma by inhibiting the expression of IL-6 and GM-CSF and MDSC accumulation."

Oncogene (2017) 36(25): 3599-3608.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method."

Methods (2001) 25(4): 402-8.

Ljunggren, H. G. and K. Kärre. "In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition."

Immunol Today (1990) 11(7): 237-44.

Long, E. O., H. S. Kim, D. Liu, M. E. Peterson and S. Rajagopalan. "Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition."

Annu Rev Immunol (2013) 31: 227-58.

Lu, H., W. M. Wagner, E. Gad, Y. Yang, H. Duan, L. M. Amon, N. Van Denend, E. R. Larson, A. Chang, H. Tufvesson and M. L. Disis. "Treatment failure of a TLR-7 agonist occurs due to self-regulation of acute inflammation and can be overcome by IL-10 blockade."

J Immunol (2010) 184(9): 5360-7.

Luangsay, S., V. Wittamer, B. Bondue, O. De Henau, L. Rouger, M. Brait, J. D. Franssen, P. de Nadai, F. Huaux and M. Parmentier. "Mouse ChemR23 is expressed in dendritic cell subsets and macrophages, and mediates an anti-inflammatory activity of chemerin in a lung disease model."

J Immunol (2009) 183(10): 6489-99.

Marra, F. and F. Tacke. "Roles for chemokines in liver disease."

Gastroenterology (2014) 147(3): 577-594.e1.

Mattern, A., T. Zellmann and A. G. Beck-Sickinger. "Processing, signaling, and physiological function of chemerin."

IUBMB Life (2014) 66(1): 19-26.

Mazo, I. B., M. Honczarenko, H. Leung, L. L. Cavanagh, R. Bonasio, W. Weninger, K. Engelke, L. Xia, R. P. McEver, P. A. Koni, L. E. Silberstein and U. H. von Andrian.

"Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells."

Immunity (2005) 22(2): 259-70.

Mazzurana, L., A. Rao, A. Van Acker and J. Mjösberg. "The roles for innate lymphoid cells in the human immune system."

Semin Immunopathol (2018) 40(4): 407-419.

Meyer, T., C. Surber, L. E. French and E. Stockfleth. "Resiquimod, a topical drug for viral skin lesions and skin cancer."

Expert Opin Investig Drugs (2013) 22(1): 149-59.

Michaelis, K. A., M. A. Norgard, X. Zhu, P. R. Levasseur, S. Sivagnanam, S. M. Liudahl, K. G. Burfeind, B. Olson, K. R. Pelz, D. M. Angeles Ramos, H. C. Maurer, K. P. Olive, L. M. Coussens, T. K. Morgan and D. L. Marks. "The TLR7/8 agonist R848 remodels tumor and host responses to promote survival in pancreatic cancer." *Nat Commun* (2019) 10(1): 4682.

Miyata, T., Y. I. Yamashita, T. Yoshizumi, M. Shiraishi, M. Ohta, S. Eguchi, S. Aishima, H. Fujioka and H. Baba. "CXCL12 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with metastasis and poor prognosis." *Cancer Sci* (2019) 110(10): 3197-3203.

Monnier, J., S. Lewen, E. O'Hara, K. Huang, H. Tu, E. C. Butcher and B. A. Zabel. "Expression, regulation, and function of atypical chemerin receptor CCRL2 on endothelial cells." *J Immunol* (2012) 189(2): 956-67.

Mullins, S. R., J. P. Vasilakos, K. Deschler, I. Grigsby, P. Gillis, J. John, M. J. Elder, J. Swales, E. Timosenko, Z. Cooper, S. J. Dovedi, A. J. Leishman, N. Luheshi, J. Elvecrog, A. Tilahun, R. Goodwin, R. Herbst, M. A. Tomai and R. W. Wilkinson. "Intratumoral immunotherapy with TLR7/8 agonist MEDI9197 modulates the tumor microenvironment leading to enhanced activity when combined with other immunotherapies." *J Immunother Cancer* (2019) 7(1): 244.

Neely, H. R., I. B. Mazo, C. Gerlach and U. H. von Andrian. "Is There Natural Killer Cell Memory and Can It Be Harnessed by Vaccination? Natural Killer Cells in Vaccination." *Cold Spring Harb Perspect Biol* (2018) 10(10).

Nguyen, K. B., T. P. Salazar-Mather, M. Y. Dalod, J. B. Van Deusen, X. Q. Wei, F. Y. Liew, M. A. Caligiuri, J. E. Durbin and C. A. Biron. "Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection." *J Immunol* (2002) 169(8): 4279-87.

Pachynski, R. K., B. A. Zabel, H. E. Kohrt, N. M. Tejeda, J. Monnier, C. D. Swanson, A. K. Holzer, A. J. Gentles, G. V. Sperinde, A. Edalati, H. A. Hadeiba, A. A. Alizadeh and E. C. Butcher. "The chemoattractant chemerin suppresses melanoma by recruiting natural killer cell antitumor defenses." *J Exp Med* (2012) 209(8): 1427-35.

Parolini, S., A. Santoro, E. Marcenaro, W. Luini, L. Massardi, F. Facchetti, D. Communi, M. Parmentier, A. Majorana, M. Sironi, G. Tabellini, A. Moretta and S. Sozzani. "The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues." *Blood* (2007) 109(9): 3625-32.

Pauken, K. E. and E. J. Wherry. "Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer." *Trends Immunol* (2015) 36(4): 265-76.

Paust, S., H. S. Gill, B. Z. Wang, M. P. Flynn, E. A. Moseman, B. Senman, M. Szczepanik, A. Telenti, P. W. Askenase, R. W. Compans and U. H. von Andrian.

"Critical role for the chemokine receptor CXCR6 in NK cell-mediated antigen-specific memory of haptens and viruses."

Nat Immunol (2010) 11(12): 1127-35.

Peng, H., X. Jiang, Y. Chen, D. K. Sojka, H. Wei, X. Gao, R. Sun, W. M. Yokoyama and Z. Tian. "Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation."

J Clin Invest (2013) 123(4): 1444-56.

Pockros, P. J., D. Guyader, H. Patton, M. J. Tong, T. Wright, J. G. McHutchison and T. C. Meng. "Oral resiquimod in chronic HCV infection: safety and efficacy in 2 placebo-controlled, double-blind phase IIa studies."

J Hepatol (2007) 47(2): 174-82.

Puengel, T., O. Krenkel, M. Kohlhepp, E. Lefebvre, T. Luedde, C. Trautwein and F. Tacke. "Differential impact of the dual CCR2/CCR5 inhibitor cenicriviroc on migration of monocyte and lymphocyte subsets in acute liver injury."

PLoS One (2017) 12(9): e0184694.

Puré, E., K. Inaba, M. T. Crowley, L. Tardelli, M. D. Witmer-Pack, G. Ruberti, G. Fathman and R. M. Steinman. "Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain."

J Exp Med (1990) 172(5): 1459-69.

Rakoff-Nahoum, S. and R. Medzhitov. "Toll-like receptors and cancer."

Nat Rev Cancer (2009) 9(1): 57-63.

Riera Romo, M., D. Pérez-Martínez and C. Castillo Ferrer. "Innate immunity in vertebrates: an overview."

Immunology (2016) 148(2): 125-39.

Robert Koch Institut, Z. f. K., Gesellschaft der Epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (2020). Krebs in Deutschland für 2015/2016. Gemeinsame Publikation des Zentrums für Krebsregisterdaten und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 12. Ausgabe.

Romagnani, C., M. Della Chiesa, S. Kohler, B. Moewes, A. Radbruch, L. Moretta, A. Moretta and A. Thiel. "Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells."

Eur J Immunol (2005) 35(8): 2452-8.

Romani, N., S. Koide, M. Crowley, M. Witmer-Pack, A. M. Livingstone, C. G. Fathman, K. Inaba and R. M. Steinman. "Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells."

J Exp Med (1989) 169(3): 1169-78.

Rosales, C. and E. Uribe-Querol. "Phagocytosis: A fundamental process in immunity."

Biomed Res Int (2017) 2017: 9042851.

Rose, S. "First-ever CAR T-cell therapy approved in U.S."

Cancer Discovery (2017) 7(10): 126.

Salazar-Mather, T. P., J. S. Orange and C. A. Biron. "Early murine cytomegalovirus (MCMV) infection induces liver natural killer (NK) cell inflammation and protection through macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha)-dependent pathways." *J Exp Med* (1998) 187(1): 1-14.

Savage, P., V. Horton, J. Moore, M. Owens, P. Witt and M. E. Gore. "A phase I clinical trial of imiquimod, an oral interferon inducer, administered daily." *Br J Cancer* (1996) 74(9): 1482-6.

Seillet, C., G. T. Belz and N. D. Huntington. "Development, homeostasis, and heterogeneity of NK cells and ILC1." *Curr Top Microbiol Immunol* (2016) 395: 37-61.

Siegal, F. P., N. Kadowaki, M. Shodell, P. A. Fitzgerald-Bocarsly, K. Shah, S. Ho, S. Antonenko and Y. J. Liu. "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* (1999) 284(5421): 1835-7.

Skrzeczyńska-Moncznik, J., A. Stefańska, B. A. Zabel, M. Kapińska-Mrowiecka, E. C. Butcher and J. Cichy. "Chemerin and the recruitment of NK cells to diseased skin." *Acta Biochim Pol* (2009) 56(2): 355-60.

Smith-Garvin, J. E., G. A. Koretzky and M. S. Jordan. "T cell activation." *Annu Rev Immunol* (2009) 27: 591-619.

Song, Y., B. Hu, Y. Liu, Z. Jin, Y. Zhang, D. Lin, Y. Zhu, L. Lei, H. Gong, Y. Mei, H. Y. Teo, D. Wu and H. Liu. "IL-12/IL-18-preactivated donor NK cells enhance GVL effects and mitigate GvHD after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Eur J Immunol* (2018) 48(4): 670-682.

Spits, H., J. H. Bernink and L. Lanier. "NK cells and type 1 innate lymphoid cells: partners in host defense." *Nat Immunol* (2016) 17(7): 758-64.

Stegmann, K. A., F. Robertson, N. Hansi, U. Gill, C. Pallant, T. Christophides, L. J. Pallett, D. Peppas, C. Dunn, G. Fusai, V. Male, B. R. Davidson, P. Kennedy and M. K. Maini. "CXCR6 marks a novel subset of T-bet(lo)Eomes(hi) natural killer cells residing in human liver." *Sci Rep* (2016) 6: 26157.

Stevens, K. E., C. L. Thio and W. O. Osburn. "CCR5 deficiency enhances hepatic innate immune cell recruitment and inflammation in a murine model of acute hepatitis B infection." *Immunol Cell Biol* (2019) 97(3): 317-325.

Sulica, A., P. Morel, D. Metes and R. B. Herberman. "Ig-binding receptors on human NK cells as effector and regulatory surface molecules." *Int Rev Immunol* (2001) 20(3-4): 371-414.

Sun, J. C. and L. L. Lanier. "Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?" *Eur J Immunol* (2009) 39(8): 2059-64.

Sun, J. C. and L. L. Lanier. "NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8⁺ T cells."

Nat Rev Immunol (2011) 11(10): 645-57.

Sun, P., M. Williams, N. Nagabhushana, V. Jani, G. Defang and B. J. Morrison. "NK cells activated through antibody-dependent cell cytotoxicity and armed with degranulation/IFN- γ production suppress antibody-dependent enhancement of dengue viral infection."

Sci Rep (2019) 9(1): 1109.

Teng, K. Y., J. Han, X. Zhang, S. H. Hsu, S. He, N. A. Wani, J. M. Barajas, L. A. Snyder, W. L. Frankel, M. A. Caligiuri, S. T. Jacob, J. Yu and K. Ghoshal. "Blocking the CCL2-CCR2 axis using CCL2-neutralizing antibody is an effective therapy for hepatocellular cancer in a mouse model."

Mol Cancer Ther (2017) 16(2): 312-322.

Tokoyoda, K., S. Zehentmeier, A. N. Hegazy, I. Albrecht, J. R. Grün, M. Löhning and A. Radbruch. "Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow."

Immunity (2009) 30(5): 721-30.

Treeck, O., C. Buechler and O. Ortmann. "Chemerin and Cancer."

Int J Mol Sci (2019) 20(15).

Uematsu, S. and S. Akira. "Toll-like receptors and innate immunity."

J Mol Med (Berl) (2006) 84(9): 712-25.

Vacchelli, E., A. Eggermont, C. Sautès-Fridman, J. Galon, L. Zitvogel, G. Kroemer and L. Galluzzi. "Trial Watch: Toll-like receptor agonists for cancer therapy."

Oncolimmunology (2013) 2(8): e25238.

Vitale, M., C. Cantoni, G. Pietra, M. C. Mingari and L. Moretta. "Effect of tumor cells and tumor microenvironment on NK-cell function."

Eur J Immunol (2014) 44(6): 1582-92.

Walter, L. and B. Petersen. "Diversification of both KIR and NKG2 natural killer cell receptor genes in macaques - implications for highly complex MHC-dependent regulation of natural killer cells."

Immunology (2017) 150(2): 139-145.

Wiedemann, G. M., S. J. Jacobi, M. Chaloupka, A. Krächan, S. Hamm, S. Strobl, R. Baumgartner, S. Rothenfusser, P. Duedel, S. Endres and S. Kobold. "A novel TLR7 agonist reverses NK cell anergy and cures RMA-S lymphoma-bearing mice."

Oncolimmunology (2016) 5(7): e1189051.

Witt, P. L., P. S. Ritch, D. Reding, T. L. McAuliffe, L. Westrick, S. E. Grossberg and E. C. Borden. "Phase I trial of an oral immunomodulator and interferon inducer in cancer patients."

Cancer Res (1993) 53(21): 5176-80.

Wittamer, V., B. Bondue, A. Guillaert, G. Vassart, M. Parmentier and D. Communi. "Neutrophil-mediated maturation of chemerin: a link between innate and adaptive immunity."

J Immunol (2005) 175(1): 487-93.

- Zabel, B. A., S. J. Allen, P. Kulig, J. A. Allen, J. Cichy, T. M. Handel and E. C. Butcher. "Chemerin activation by serine proteases of the coagulation, fibrinolytic, and inflammatory cascades."
J Biol Chem (2005) 280(41): 34661-6.
- Zabel, B. A., T. Ohyama, L. Zuniga, J. Y. Kim, B. Johnston, S. J. Allen, D. G. Guido, T. M. Handel and E. C. Butcher. "Chemokine-like receptor 1 expression by macrophages in vivo: regulation by TGF-beta and TLR ligands."
Exp Hematol (2006) 34(8): 1106-14.
- Zajac, A. J., K. Murali-Krishna, J. N. Blattman and R. Ahmed. "Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells."
Curr Opin Immunol (1998) 10(4): 444-9.
- Zander, R., D. Schauder, G. Xin, C. Nguyen, X. Wu, A. Zajac and W. Cui. "CD4(+) T cell help is required for the formation of a cytolytic CD8(+) T cell subset that protects against chronic infection and cancer."
Immunity (2019) 51(6): 1028-1042.e4.
- Zhang, C., Y. Hu and C. Shi. "Targeting natural killer cells for tumor immunotherapy."
Front Immunol (2020) 11: 60.
- Zhang, M., B. Wen, O. M. Anton, Z. Yao, S. Dubois, W. Ju, N. Sato, D. J. DiLillo, R. N. Bamford, J. V. Ravetch and T. A. Waldmann. "IL-15 enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by NK cells and macrophages."
Proc Natl Acad Sci U S A (2018) 115(46): E10915-e10924.

8. Verzeichnis der Abkürzungen

ADCC	Antikörper-vermittelte zellgebundene Zytotoxizität
APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CASP1	Caspase-1
CCRL2	<i>C-C chemokine receptor-like 2</i>
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
ChemR23	<i>Chemerin receptor 23</i>
CMKLR1	<i>Chemokine like receptor 1</i>
CMV	Cytomegalievirus
CpG	Cytosin-(phosphat)-Guanin-Dinukleotid
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	<i>double stranded</i> Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GPR1	<i>G protein-coupled receptor 1</i>
HCC	<i>Hepatocellular carcinoma</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IRAK 1/ 4	IL-1R-assozierte Kinase 1/ 4
IRF3	<i>IFN regulatory factor 3</i>
KIR	<i>Killer-inhibitory receptor</i>
LPS	Lipopolysaccharid

MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
mCMV	Murines Cytomegalievirus
MCP 1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MDC	<i>Macrophage-derived chemokine</i>
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min	Minute(n)
Mio	Million(en)
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
NF-KB	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NKG2D	<i>Natural killer group 2D</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-A-Protein
PRR	<i>Patternrecognition-Rezeptor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SEM	<i>Standard error of mean</i>
ssRNA	<i>single stranded</i> Ribonukleinsäure
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TH	T-Helfer
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TZR	T-Zellrezeptor

9. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zunächst meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Sebastian Kobold, für die Ermöglichung der Promotion, die herausragende wissenschaftliche Förderung und Begleitung in der Promotionsphase, sowie für die Auswahl des Themas. Sein wissenschaftlicher Ehrgeiz hat mich stets beeindruckt und nachhaltig geprägt.

Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Endres, der als Abteilungsleiter der Klinischen Pharmakologie immer für ein angenehmes und produktives Arbeitsumfeld gesorgt hat. Sein großes Engagement junge Mediziner für eine grundlagenwissenschaftliche Tätigkeit zu begeistern inspiriert mich auch heute noch auf meinem weiteren Weg.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Betreuerin Dr. med. Gabriela Wiedemann und meinem Kollegen Severin Jacobi für die Geduld in der Einarbeitungsphase und die Mithilfe während der gesamten Laborzeit sowie darüber hinaus.

Ich danke allen Doktoranden und Mitarbeitern der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die herausragende Unterstützung und Zusammenarbeit. Ich freue mich sehr, aus dieser Zeit viele neue und fortbestehende Freundschaften gewonnen zu haben.

Meiner Familie möchte ich einen besonderen Dank aussprechen. Ohne deren Rückhalt und die ständige Motivation mit positiven Worten wäre das Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Herzlichen Dank auch an Pascal, für sein aufgebrachtes Verständnis und die Unterstützung in der finalen, besonders stressreichen Phase.

10. Veröffentlichungen

Wiedemann G.M., S.J. Jacobi, M. Chaloupka, **A. Krächan**, S. Hamm, S. Strobl, R. Baumgartner, S. Rothenfusser, P. Duewell, S. Endres, S. Kobold. „A Novel TLR7-agonist Reverses NK Cell Anergy and Cures RMA-S Lymphoma-bearing Mice.” *Oncoimmunology* (2016). 5(7): e1189051

Wiedemann G. M., C. Aithal, **A. Kraechan**, C. Heise, B. L. Cadilha, J. Zhang, P. Duewell, R. Ballotti, S. Endres, C. Bertolotto, S. Kobold. „Micoophthalmia-associated transcription factor (MITF) regulates immune cell migration into melanoma.” *Translational Oncology* (2019): 12(2):350-360.

L. T. Weckbach, A. Curta, S. Bieber, **A. Kraechan**, J. Brado, J.C. Hellmuth, M. Muenchhoff, C. Scherer, I. Schroeder, M. Irlbeck, S. Maurus, J. Ricke, K. Klingel, S. Kääb, M. Orban, S. Massberg, J. Hausleiter, U. Grabmaier. “Myocardial inflammation and transient myocardial dysfunction in COVID-19-associated myocardial Injury.” *Circ Cardiovasc Imaging*. (2021) Jan 19: *Circ Image*. Online ahead of print.

S. Bieber, **A. Kraechan**, J.C. Hellmuth, M. Muenchhoff, C. Scherer, I. Schroeder, M. Irlbeck, S. Kaeaeab, S. Massberg, J. Hausleiter, U. Grabmaier, M. Orban & L.T. Weckbach. “Transient left and right ventricular dysfunction in patients with COVID-19-associated myocardial Injury.” *Infection* (2021) Jan 30:1-10.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Angelina Krächan, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Migrationsverhalten der NK-Zellen nach Stimulation mit dem TLR7-Agonisten Resiquimod“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 17.01.2022

Ort, Datum

Angelina Krächan

Unterschrift