

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Schwangerschaftsbezogene Veränderungen des  
NK-Zell-Phänotyps bei Multipler Sklerose

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Wisgalla

Datum der Promotion: 4. März 2022

*Für meine Eltern Kerstin und Torsten*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>X</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>XI</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XII</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems .....	1
1.1.1 Populationen und Diversität der humanen NK-Zellen .....	2
1.1.2 NK-Zell-Aktivierung als Resultat inhibierender und aktivierender Signale.....	3
1.1.3 Immunregulation durch NK-Zellen .....	4
1.2 NK-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose .....	5
1.2.1 Überblick zur Ätiologie und Pathogenese der MS.....	5
1.2.2 Rolle der NK-Zellen in der Pathogenese von EAE und MS .....	7
1.3 Endogene Immuntoleranz während der Schwangerschaft .....	11
1.3.1 Grundkonzept zum Immunsystem während der Schwangerschaft .....	12
1.4 Immunregulatorische Mechanismen während der Schwangerschaft bei MS.....	13
1.4.1 Protektion vor klinischer Aktivität während der Schwangerschaft bei MS .....	14
1.4.2 Systemische Anpassungen der maternalen Immunität während der Schwangerschaft.....	14
<b>2 Zielsetzung</b> .....	<b>18</b>
<b>3 Material und Methodik</b> .....	<b>19</b>
3.1 Patientinnen.....	19
3.1.1 Überblick zur Schwangerschaftskohorte.....	19
3.1.2 Demografische und klinische Merkmale .....	20
3.1.3 Gewinnung des Zellmaterials .....	23
3.1.4 Magnetresonanztomografie.....	24
3.2 Material.....	24
3.3 Durchflusszytometrie .....	27

3.3.1	Grundlagen der Durchflusszytometrie .....	27
3.3.2	Oberflächenfärbung mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern.....	28
3.3.3	Etablierung des Multicolor-Antikörper-Panels.....	29
3.3.4	Übersicht zum durchflusszytometrischen Panel der NK-Zell-Studie .....	38
3.3.5	Durchflusszytometrische Messung.....	40
3.4	Analyse der durchflusszytometrischen Daten .....	40
3.4.1	Manuelle Analyse mittels sequentiell bivariaten Gatings .....	40
3.4.2	Automatisierte Analyse mittels bioinformatischer Methoden.....	43
3.4.3	Probenqualität und Konsequenzen für die Datenanalyse .....	49
3.5	Statistik.....	51
3.5.1	Wilcoxon-Test .....	52
3.5.2	Multiples Testen.....	52
3.6	Angaben zu Kollaborationen.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1	Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen während und nach der Schwangerschaft bei MS.....	54
4.1.1	Anteil der angeborenen lymphatischen Zellen.....	54
4.1.2	Veränderung der klassischen NK-Zell-Populationen CD56 <sup>bright</sup> /CD56 <sup>dim</sup> .....	56
4.2	Detaillierte Charakterisierung des NK-Zell-Phänotyps während und nach der Schwangerschaft bei MS.....	63
4.2.1	Schwangerschaftsbezogener Phänotyp der CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der manuellen Analyse.....	63
4.2.2	Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Subsets innerhalb der CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der automatisierten Analyse.....	69
4.2.3	Schwangerschaftsbezogener Phänotyp der CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der manuellen Analyse.....	78
4.2.4	Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Subsets innerhalb der CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der automatisierten Analyse.....	84
4.2.5	Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Subsets mit gemischter Zusammensetzung aus CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen .....	86
4.2.6	Synopsis zum NK-Zell-Phänotyp im Kontext der MS-Schwangerschaft.....	89

4.3	Klinische und radiologische Krankheitsaktivität während und nach der Schwangerschaft bei MS.....	91
4.3.1	Klinische Merkmale der Kohorte.....	91
4.3.2	Beurteilung der MS-Aktivität anhand radiologischer Merkmale.....	92
4.3.3	Zusammenhang zwischen Läsionslast und NK-Zell-Phänotyp in der postpartalen Phase	94
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
5.1	Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen .....	97
5.1.1	Weitere Studien zu den NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS.....	97
5.1.2	Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Dynamik bei gesunden und vorerkrankten Frauen	98
5.1.3	NK-Zell-Dynamik im Kontext der exogen induzierten Immunmodulation.....	101
5.2	Detaillierte Charakterisierung des NK-Zell-Phänotyps .....	101
5.2.1	Potentielle Auswirkungen auf die NK-Zell-Aktivität .....	102
5.2.2	Bedeutung des CD56 <sup>dim</sup> NK-Zell-Phänotyps.....	104
5.2.3	Bedeutung des CD56 <sup>bright</sup> NK-Zell-Phänotyps.....	105
5.2.4	Neue Perspektiven auf die NK-Zell-vermittelte Immunregulation .....	105
5.2.5	Rolle der NK-Zellen in der Immunregulation auf Ebene des Organismus .....	110
5.3	Postpartale Krankheitsaktivität und NK-Zell-Phänotyp .....	112
5.4	Schlussfolgerung .....	113
5.4.1	Limitationen.....	113
5.4.2	Hypothesen für zukünftige Forschung .....	114
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>119</b>
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>132</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>133</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>134</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständige Bezeichnung</b>
ADCC	Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität
aHSCT	Autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation
Alexa	Alexa Fluor®
APC	Antigenpräsentierende Zelle
BP	Band Pass
BUV	Brilliant Ultraviolet
BV	Brilliant Violet
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	Cluster of Differentiation
CILP	Common Innate Lymphoid Progenitor
CIS	Klinisch-isoliertes Syndrom
CS&T	Cytometer Setup and Tracking
CV	Cross Validation
Cy5.5	Cyanin 5.5
DC	Dendritische Zelle
DMF	Dimethylfumarat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMT	Disease-Modifying Therapy
dNK	Deziduale natürliche Killerzellen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDSS	Expanded Disability Status Scale
Eomes	Eomesodermin
EVT	Extravillösen Trophoblasten
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FDR	False Discovery Rate
FSC	Vorwärtsstreulicht
GA	Glatirameracetat
GK	Glukokortikoiden
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständige Bezeichnung</b>
ILC	Innate Lymphoid Cells
IVIg	Intravenöse Immunglobuline
KIR	Killer Immunoglobulin-like Receptors
LP	Long Pass
MHC	Major Histocompatibility Complex
min.	Minuten
ML	Machine Learning
MRT	Magnetresonanztomografie
MS	Multiple Sklerose
MST	Minimal Spanning Tree
NCR	Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor
NCRC	NeuroCure Clinical Research Center
NK	Natürliche Killerzellen
PAM	Prediction for Microarrays
PB	Peripheres Blut
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein-Komplex
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMT	Photomultiplier Tubes
PP	Postpartal
PPMS	Primär progrediente Multiple Sklerose
pre	Vor der Schwangerschaft (Bezeichnung für Studienzeitpunkt)
RA	Rheumatoide Arthritis
RCT	Randomisiert-kontrollierten Studie
RRMS	Relapsing-remitting (schubförmige) Multiple Sklerose
SAM	Significance Analysis of Microarrays
SE	Spreading Error
SI	Staining Index
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SLT	Secondary Lymphoid Tissues
SNR	Signal-to-Noise Ratio
SOM	Self-Organizing Maps
SOV	Spillover Values
SP	Short Pass

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständige Bezeichnung</b>
SPMS	Sekundär progrediente Multiple Sklerose
SSC	Seitwärtsstreulicht
T1D	Diabetes mellitus Typ I
T2LV	Volumen der T2-gewichteten Läsionen
T-bet	T-box expressed in T cells
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
Treg	Regulatorische T-Zelle
Tri	Trimester
ZNS	Zentralnervensystem

---

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Überblick zu den Patientinnen .....	20
Abbildung 2. Grad der Behinderung nach Expanded Disability Status Scale (EDSS) .....	23
Abbildung 3. Messprinzipien der Durchflusszytometrie.....	28
Abbildung 4. Titration des anti-CD27 Antikörpers (Klon M-T271) konjugiert mit PE .....	35
Abbildung 5. Spreading Error im Alexa700 Channel.....	38
Abbildung 6. Gating-Strategie zur Identifikation der NK-Zellen .....	41
Abbildung 7. Analyse der Markerexpression auf CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen .....	42
Abbildung 8. Markerexpression der FlowSOM-Metaclustern .....	47
Abbildung 9. Markerexpression der Citrus-Cluster.....	48
Abbildung 10. Probenqualität.....	50
Abbildung 11. Frequenz der CD56 <sup>+</sup> NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten.....	54
Abbildung 12. Frequenz der CD127 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> Zellen innerhalb der Lin <sup>-</sup> Lymphozyten.....	55
Abbildung 13. Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> im Kontext der Schwangerschaft bei MS.....	57
Abbildung 14. Klassische NK-Zell-Populationen CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> analysiert mit dem FlowSOM-Algorithmus.....	60
Abbildung 15. Beurteilung der Performance des FlowSOM-Clustering. ....	61
Abbildung 16. Aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen .....	66
Abbildung 17. CCR7-Expression auf CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen.....	67
Abbildung 18. CD56 <sup>bright</sup> Metacluster während und nach der Schwangerschaft bei MS .....	72
Abbildung 19. CD56 <sup>bright</sup> Citrus-Cluster während und nach der Schwangerschaft bei MS .....	76
Abbildung 20. Frequenz der CD16 <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen.....	78
Abbildung 21. Aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen .....	81
Abbildung 22. Maturations- und Migrationsmarker auf CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen .....	82
Abbildung 23. CD127-Expression auf CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen.....	82
Abbildung 24. CD56 <sup>dim</sup> Metacluster während und nach der Schwangerschaft bei MS .....	85
Abbildung 25. Metacluster mit gemischter Zusammensetzung aus CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen während und nach der Schwangerschaft bei MS .....	88
Abbildung 26. Läsionslast vor und nach der Schwangerschaft bei MS. ....	93
Abbildung 27. Zusammenhang zwischen dem postpartalen Läsionsvolumen und der Reduktion der CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen.....	94
Abbildung 28. NK-Zell-Phänotyp in der Schwangerschaft bei MS.....	115

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. NK-Zell-vermittelte Kontrolle von T-Zellen.....	10
Tabelle 2. Merkmale der Schwangerschaft.....	21
Tabelle 3. Merkmale der Multiplen Sklerose .....	21
Tabelle 4. Therapie der Multiplen Sklerose (MS) vor und nach der Schwangerschaft .....	22
Tabelle 5. Medien/Puffer .....	25
Tabelle 6. Weitere Reagenzien .....	25
Tabelle 7. Antikörper .....	25
Tabelle 8. Verbrauchsmaterialien .....	26
Tabelle 9. Geräte.....	26
Tabelle 10. Software .....	27
Tabelle 11. Marker der NK-Zell-Phänotypisierung .....	31
Tabelle 12. Multicolor-Panel zur NK-Zell-Phänotypisierung .....	39
Tabelle 13. Cut-off-Kriterien zur Probenqualität.....	51
Tabelle 14. Statistik zu den Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen .....	62
Tabelle 15. Markerexpression auf CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen. ....	64
Tabelle 16. Statistik zur Markerexpression der CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen.....	68
Tabelle 17. Zellfrequenz und Phänotyp der CD56 <sup>bright</sup> FlowSOM-Metacluster.....	71
Tabelle 18. Statistik zur Zellfrequenz der FlowSOM-Metacluster.....	73
Tabelle 19. Markerexpression auf CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen. ....	79
Tabelle 20. Statistik zur Markerexpression der CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen.....	83
Tabelle 21. Zellfrequenz und Phänotyp der CD56 <sup>dim</sup> FlowSOM-Metacluster.....	85
Tabelle 22. Zellfrequenz und Phänotyp der FlowSOM-Metacluster mit gemischter Zusammensetzung aus CD56 <sup>bright</sup> und CD56 <sup>dim</sup> NK-Zellen .....	87

## Zusammenfassung

Die Schwangerschaft geht mit einer tiefgreifenden Modulation des maternalen Immunsystems einher, welche bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine verminderte Krankheitsaktivität bedingt. Im Kontext der Multiplen Sklerose (MS) führt die Schwangerschaft zu einer Reduktion der Schubrate um 70-80 % im dritten Trimester, gefolgt von einem Anstieg der MS-Aktivität in den ersten sechs postpartalen Monaten. Während dieser protektive Effekt der Schwangerschaft auf die MS-Krankheitsaktivität in zahlreichen Studien belegt wurde, sind die zugrunde liegenden biologischen Mechanismen kaum verstanden. Die natürlichen Killerzellen (NK) könnten hier von Bedeutung sein, so wurde eine erhöhte CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz im dritten Trimester der Schwangerschaft bei MS berichtet. Aufgrund ihrer immunregulatorischen Kapazität wird die protektive Rolle der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der MS-Pathogenese diskutiert. Mit Blick auf die Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS fehlen jedoch weitere Studien, die diese Beobachtung verifizieren und darüber hinaus detaillierte Informationen dazu liefern, wie NK-Zellen zur Protektion vor Autoimmunität während der Schwangerschaft beitragen könnten.

Mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie zeigt die vorliegende Monografie erstmals im Detail, dass NK-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft bei MS einen regulatorischen Phänotyp annehmen. Übereinstimmend mit der bisherigen Literatur wiesen die acht längsschnittlich beobachteten MS-Patientinnen einen signifikanten Anstieg der CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz im dritten Trimester der Schwangerschaft auf, gefolgt von einer Reduktion in den ersten drei postpartalen Monaten. Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen folgten entsprechend einem inversen Muster. In der vertiefenden Charakterisierung des NK-Zell-Phänotyps fand sich während der späten Schwangerschaft eine erhöhte Expression von NK-Zell-Rezeptoren, die für Zellaktivierung und Zytotoxizität relevant sind, wie etwa die Hochregulierung von NKp46 und NKG2A auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Mit Hilfe der Algorithmen-basierten Analyse gelang die Identifikation einer CD56<sup>bright</sup> Subpopulation mit CD16<sup>+</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp, die das vorherrschende CD56<sup>bright</sup> Subset während der Schwangerschaft bildete und in der postpartalen Phase wiederum abnahm. Zusätzlich wiesen die MRT-Aufnahmen in der gleichen Kohorte auf eine postpartale Zunahme der entzündlichen MS-Aktivität, die zeitlich mit der Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zusammenfiel. Insgesamt deuten die Daten der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Schwangerschaft bei MS eine Expansion von regulatorischen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen induziert, die über eine erhöhte Expression verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren verfügen. Obwohl die explorativen Ergebnisse dieser Arbeit vorerst in größeren Studien bestätigt werden müssen, wäre denkbar, dass der hier beobachtete Phänotyp eine gesteigerte regulatorische NK-Zell-Aktivität begünstigt und somit z.B. über die Suppression autoreaktiver T-Zellen zur Reduktion der autoimmunen Aktivität während der Schwangerschaft beiträgt.

## Abstract

Pregnancy induces a profound modulation of the maternal immune system resulting in a substantially diminished activity of many autoimmune diseases. In multiple sclerosis (MS), relapse rate decreases by 70-80% in the third trimester in comparison to pre-pregnancy followed by an increase in the first 6 months postpartum. Whereas the clinical impact of pregnancy on MS disease activity has been consistently observed over the past decades, the biological mechanisms driving these effects remain incompletely understood. CD56<sup>bright</sup> natural killer (NK) cells have been reported to exhibit elevated frequencies during the third trimester of pregnancy in MS. Due to their immunoregulatory capacity that seems to be impaired in MS and re-established through disease-modifying drugs, CD56<sup>bright</sup> NK cells are considered to exert a protective role in MS pathogenesis. With regard to pregnancy in MS, however, the expansion of CD56<sup>bright</sup> NK cells has not been replicated yet, nor do detailed information on NK cell phenotype exist that could explain how NK cells contribute to protection from autoimmunity during pregnancy.

Utilising multicolour flow cytometry, the present thesis demonstrates for the first time in detail that NK cells shift toward a regulatory phenotype over the course of pregnancy in MS. Longitudinal observation of 8 MS patients indicated a significant increase of CD56<sup>bright</sup> NK cell frequency in the third trimester compared to first trimester followed by a sustained decrease by 3 months postpartum, thus, replicating previous findings in the literature. Accordantly, CD56<sup>dim</sup> NK cells followed an inverse pattern. In-depth phenotyping in the same cohort revealed an enhanced expression of NK cell receptors relevant for cell activation and cytotoxicity during late pregnancy, e.g., NKp46 and NKG2A on both CD56<sup>bright</sup> and CD56<sup>dim</sup> NK cells. Within the CD56<sup>bright</sup> population, machine learning algorithms identified a CD16<sup>+</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> cluster that represented the dominant CD56<sup>bright</sup> subset in late-pregnancy and decreased postpartum. Additionally, MRI data on T2 lesion volume showed a postpartum increase in brain inflammation occurring simultaneously to the reduction of CD56<sup>bright</sup> NK cells. Together, the data presented here indicate that pregnancy in MS promotes an expansion of regulatory CD56<sup>bright</sup> NK cells with elevated levels of activating and inhibitory receptors. Although findings need to be confirmed in larger studies, this pregnancy-associated phenotype might enhance the immunoregulatory capacity of NK cells, e.g., their potential to suppress autoreactive T cells or to shape dendritic cells, thus, contributing to the protective effect of pregnancy on human autoimmunity.

# 1 Einleitung

## 1.1 NK-Zellen als Teil des angeborenen Immunsystems

Das Immunsystem sichert die Integrität des menschlichen Organismus vor endogenen und exogenen Schädigungen, etwa durch Abwehr von infektiösen Mikroorganismen, aber auch durch Elimination gestresster oder mutierter Körperzellen. Realisiert werden diese Aufgaben durch eine Kombination aus zellulärer Antwort – ein komplexes Netzwerk aus spezialisierten Immunzellen überwacht periphere und lymphatische Gewebe – und humoralen Mechanismen – lösliche Proteine wie Antikörper und Komplement. Eingeteilt wird das Immunsystem zudem in einen angeborenen und einen adaptiven Arm. Die angeborene Immunität bietet sofort greifende Mechanismen der Abwehr. Die Pathogenerkennung erfolgt dabei über ubiquitär verbreitete, mikrobielle Strukturen (pathogen-associated molecular patterns = PAMPs) und die resultierende Immunreaktion dient v.a. zwei Zielen: der raschen Elimination des Erregers durch Effektormechanismen wie Phagozytose oder Zytotoxizität und der Rekrutierung weiterer Immunzellen durch Zytokine und Chemokine. Kernmerkmal der adaptiven Immunität ist ihre Antigen-spezifität. Die somatische Rekombination von Immunglobulinen bzw. T-Zell-Rezeptoren bedingt ein enormes Repertoire von einzelnen T- und B-Lymphozyten, die jeweils eine Rezeptorvariante mit Spezifität für ein bestimmtes Antigen exprimieren. Im Fall einer Infektion werden diejenigen Lymphozyten mit Spezifität für die Peptidstrukturen des Erregers selektioniert und klonal expandiert. Auf diese Weise kann nach einigen Tagen eine hochspezifische Elimination des Pathogens erfolgen. (Überblick basierend auf (1)).

Die Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gehören zur Gruppe der angeborenen lymphatischen Zellen (ILC, innate lymphoid cells) (2). Als Lymphozyten, die keine somatisch rekombinierten Antigenrezeptoren exprimieren, werden sie dem angeborenen Immunsystems zugeordnet (3). Die Bezeichnung ‚Killerzelle‘ erhielten die NK-Zellen, weil zuerst ihre spontane zytotoxische Aktivität gegenüber bestimmten Tumorzelllinien entdeckt wurde (1975 in (4, 5)). NK-Zellen verfügen sowohl über die Fähigkeit dysregulierte Zielzellen durch Zytotoxizität ohne vorherige Immunisierung abzutöten, als auch immunmodulatorische Zytokine (z.B. IFN- $\gamma$ ) zu sezernieren. Entsprechend sind NK-Zellen als Effektorzellen der angeborenen Immunität essentiell an der Abwehr intrazellulärer Erreger sowie der Immunüberwachung von Tumorzellen beteiligt, modulieren überdies als regulatorische Zellen die angeborene und adaptive Immunantwort und üben als geweberesidente NK-Zellen organspezifisch Funktionen aus (6, 7).

### 1.1.1 Populationen und Diversität der humanen NK-Zellen

Innerhalb des peripheren Bluts (PB) finden sich aus der ILC-Gruppe fast ausschließlich NK-Zellen, die hier neben T- und B-Zellen mit etwa 5-15% eine der drei Lymphozyten-Linien bilden (7). Ihre Entwicklung geht vom gemeinsamen ILC-Progenitor (CILP) aus und bedarf der Transkriptionsfaktoren T-box Transkriptionsfaktor (T-bet) und Eomesodermin (Eomes) (2). Die Klassifikation humaner NK-Zellen orientiert sich an der variierenden Expression von CD56 (neurales Zelladhäsionsmolekül-1, NCAM1) und CD16 (Fcγ-Rezeptor IIIa). Hiernach bilden CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> und CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-/dim</sup> (im Folgenden als CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> bezeichnet) distinkte NK-Zell-Populationen des peripheren Bluts (8).

#### *CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen als zytotoxische Killer*

CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen stellen die überwiegende Mehrheit der PB NK-Zellen dar (ca. 90%) und werden aufgrund ihres hohen zytotoxischen Potentials auch als zytotoxische NK-Zellen bezeichnet. Ihr Phänotyp ist durch eine hohe Expression von CD16 (CD16<sup>bright</sup>), Perforin und Granzymen (in intrazellulären Granula) sowie durch hohe Level der stark polymorphen KIR (,killer immunoglobulin-like receptors') gekennzeichnet. U.a. die KIR ermöglichen es den CD56<sup>dim</sup> virusinfizierte und entartete Zellen zu identifizieren und abzutöten, die aufgrund fehlender MHC-I-Merkmale vor dem Angriff durch zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen geschützt sind. Somit komplementieren CD56<sup>dim</sup> die T-Zell-Zytotoxizität in der Tumor-Surveillance und durch die frühzeitige Kontrolle intrazellulärer Infektionen (7).

CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (aber auch CD56<sup>bright</sup>) können Zielzellen über verschiedene Modi (dargestellt in (9)) der Zytotoxizität abtöten: (i) NK-Zell-Rezeptoren getriggerte natürliche Zytotoxizität und (ii) antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC) vermittelt über den Fcγ-Rezeptor IIIa (CD16), welcher über Ligation mit gebundenen Immunglobulinen auf der Zielzelle die NK-Aktivierung triggert, resultieren in der Degranulation von zytolytisch wirksamen Perforin und Granzymen. Ein weiterer Mechanismus besteht im (iii) Todesrezeptor-vermittelten Killing (z.B. Fas und TRAIL).

#### *CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als Immunregulatoren*

Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen finden sich in weit geringerem Ausmaß im Blut (≤15% aller PB NK-Zellen). Sie exprimieren nur geringe Level von KIR, CD16 und zytolytischen Granula, jedoch hohe Mengen an CD94/NKG2A. Oft als regulatorische NK-Zell-Population beschrieben, können CD56<sup>bright</sup> rasch große Mengen verschiedener Zytokine produzieren und somit die angeborene und adaptive Immunantwort beeinflussen (7). Das von CD56<sup>bright</sup> innerhalb von Minuten nach Aktivierung in großen Mengen freigesetzte IFN-γ gilt als Leitzytokin der NK-Zellen und verfügt

über eine Reihe immunmodulatorischer Eigenschaften (Review in (9)). IFN- $\gamma$  stimuliert die Zytokinsekretion und MHC-I-Expression der antigen-präsentierenden Zellen (APCs), triggert das Killing intrazellulär infizierter Zellen durch Makrophagen, beeinflusst Th1-Immunantwort und wirkt antiproliferativ auf infizierte oder entartete Zielzellen. Des Weiteren werden von NK-Zellen TNF- $\alpha$  und IL-10, Wachstumsfaktoren wie GM-CSF und Chemokine, die der Colokalisation mit anderen Immunzellen im entzündeten Gewebe dienen, freigesetzt (3).

### *Diversität humaner NK-Zell-Populationen*

Die dichotome Einteilung der NK-Zellen anhand der CD56-Expression stößt jedoch zunehmend an die Grenzen neuer Erkenntnisse zur biologischen Realität. So kann ausgehend von den phänotypischen Prototypen CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> keine Aussage zur funktionellen Kapazität getroffen werden. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, lange Zeit v.a. als hocheffektive Killerzellen betrachtet, können im Kontakt zur Zielzelle ebenfalls überaus rasch IFN- $\gamma$  produzieren (10). Nach adäquater Aktivierung erreichen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eine zytotoxische Aktivität vergleichbar mit der der CD56<sup>dim</sup>, etwa gegenüber autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen (11).

High Throughput Methoden wie Single Cell RNA-Sequenzierung oder Massenzytometrie ermöglichen zudem den Blick auf die bisher unterschätzte Diversität humaner NK-Zell-Populationen im peripheren Blut (12, 13). Wachsende Erkenntnisse zu den NK-Zellen im Gewebe (z.B. Lymphknoten, Leber, Uterus) beschreiben darüber hinaus eine heterogene Population geweberesidenter CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen ('tissue-resident NK cells', trNK), die sich phänotypisch und funktionell von den konventionellen NK-Zellen des peripheren Bluts unterscheiden (14).

### **1.1.2 NK-Zell-Aktivierung als Resultat inhibierender und aktivierender Signale**

NK-Zellen verfügen über ein komplexes Set an nicht-rekombinierten inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren. Die Summe aus aktivierenden und inhibierenden Signalen in Interaktion mit der Zielzelle und dem Zytokin-Microenvironment reguliert die Aktivierung einer NK-Zelle; in Form eines 'dynamischen Equilibriums' resultierte entweder Aktivierung oder Inhibition je nach dominierendem Einfluss (6).

Inhibitorische NK-Zell-Rezeptoren erkennen die von Körperzellen konstitutiv exprimierte Selbst-Merkmale, darunter hauptsächlich MHC-Klasse-I-Moleküle (6). Zu den inhibitorischen MHC-I-Rezeptoren gehören die KIR ('killer immunoglobulin-like receptors') sowie das C-Typ-Lektin-ähnliche Rezeptorheterodimer CD94/NKG2A (15). Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren erfassen die Signale von zellulärem Stress und fremde, infektiions-assoziierte Moleküle (3). Vertreter sind u.a. NKG2D, DNAM-1, die natürlichen Cytotoxizitätsrezeptoren (NCR); aber auch aktivierende KIR

und das aktivierende CD94/NKG2C existieren (15). Die Disinhibition der NK-Zelle bei fehlenden MHC-I-Signalen stellt eine entscheidende Voraussetzung zur Aktivierung dar (sog. ‚missing self‘, (16)). Allerdings bedarf es zusätzlich der Stimulation der aktivierenden Rezeptoren, welche das inhibitorische Input überwiegen muss, um zur NK-Zell-Aktivierung zu führen (3).

Die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren spielen auch bei der ‚NK-Zell-Lizensierung‘ eine Rolle, die sicherstellt, dass reife NK-Zellen tolerant gegenüber körpereigenen Zellen sind. Um eine regelrechte Funktionalität zu erlangen, müssen NK-Zellen während der Entwicklung über ihre inhibitorischen MHC-I-Rezeptoren mit korrespondierenden MHC-I-Molekülen interagieren. Fehlt diese Interaktion, verbleiben die Zellen in einem hyporesponsiven Zustand, in dem auf Bindung aktivierender Signale keine oder nur geringe zytolytische Aktivität folgt (17).

### 1.1.3 Immunregulation durch NK-Zellen

NK-Zellen schützen über Zytotoxizität und immunstimulierende Zytokine nicht nur direkt vor intrazellulären Pathogenen und Malignität, sondern modulieren auf diese Weise auch die Immunreaktion des angeborenen und adaptiven Immunsystems. Die NK-Zell-vermittelte Immunregulation kann sowohl durch Stimulation, aber auch durch suppressives ‚Shaping‘ von anderen Immunzellpopulationen erfolgen. NK-Zellen sind z.B. in der Lage Makrophagen/Monozyten und Neutrophile durch direkte Zytotoxizität abzutöten (18, 19). In Interaktion mit DCs können CD56<sup>bright</sup> zum einen die DC-Maturation durch TNF- $\alpha$  und GM-CSF fördern; sie üben aber auch Zytotoxizität gegenüber immature DCs aus, was vermutlich einen Editierungsvorgang zur Reduktion hyporesponsiver DCs darstellt (20). Im Kontakt zu T-Zellen tragen CD56<sup>bright</sup> einerseits mittels IFN- $\gamma$  direkt zum Priming von CD4<sup>+</sup> Th1-Zellen bei (21), andererseits ist die NK-T-Zell-Interaktion wesentlich vom Abtöten autologer CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch NK-Zellen geprägt (22). Ort dieser Interaktionen bildet die parafollikuläre Zone der Lymphknoten, in der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in unmittelbarer Nähe zu DCs und T-Zellen vertreten sind (23).

Diese modulatorischen NK-Zielzell-Interaktionen verweisen bereits auf das destruktive *und* protektive Potential von NK-Zellen im Kontext der Autoimmunität. Es ist nach wie vor umstritten, ob NK-Zellen z.B. durch Induktion von APCs bzw. durch zytotoxische Attacken direkt im Gewebe die autoimmune Inflammation propagieren oder aber durch Suppression der autoreaktiven adaptiven Immunantwort zur Protektion beitragen (24, 25). Die sog. NK-Degeneration – Defizite der NK-Zell-Frequenz bzw. der NK-Zytotoxizität, die bei vielen Autoimmunerkrankungen beobachtet wurden – deutet auf eine grundsätzlich protektive Rolle der NK-Zellen hin, die jedoch im Rahmen der Pathogenese eingeschränkt ist (25).

## 1.2 NK-Zellen in der Pathogenese der Multiplen Sklerose

Multiple Sklerose (MS) ist eine chronisch inflammatorische und neurodegenerative Erkrankung des zentralen Nervensystems. Weltweit sind ca. 2,5 Millionen Patienten betroffen. Das Manifestationsalter liegt im Durchschnitt bei 30 Jahren. Als häufigster Grund neurologischer Beeinträchtigung im jungen Erwachsenenalter stellt die MS eine erhebliche individuelle sowie sozioökonomische Belastung dar (26).

Das klinische Bild der MS ist Ausdruck der örtlich und zeitlich disseminierten, autoimmunen Inflammation im ZNS. Es werden zwei Verlaufsformen unterschieden: die schubförmige MS (relapsing-remitting, RRMS) tritt in 85-90% der Fälle auf, zeigt einen Erkrankungsgipfel um das 30. Lebensjahr und betrifft etwa dreimal häufiger Frauen; die primär progrediente MS (PPMS) betrifft 10% der Patienten (mittleres Erkrankungsalter 40 Jahre) und weist keinen Häufigkeitsunterschied zwischen den Geschlechtern auf. Charakteristisch für die schubförmige MS sind akute Episoden neurologischer Dysfunktion, welche das klinische Korrelat der inflammatorischen, demyelinisierenden Läsionen sind und sich abhängig von der Läsionslokalisation in Sensibilitätsstörungen, Paresen, Gangstörungen, Sehstörungen bei einseitige Optikusneuritis oder Hirnnervenausfälle äußern. Auf die Schübe folgen typischerweise Phasen der Remission, in denen die entzündliche Aktivität rückläufig ist und von kompletter oder inkompletter Symptomrückbildung begleitet wird. Im Verlauf kann die RRMS eine sekundär-progrediente Form (SPMS) übergehen, die von einer kontinuierlichen Krankheitsprogression mit akkumulierenden neurokognitiven und motorischen Defiziten geprägt ist (27).

Die Diagnose MS kann gestellt werden, wenn (a) neurologische Defizite in Anamnese und klinisch-neurologischer Untersuchung objektiviert wurden, die typisch für zentralnervöse, demyelinisierende Ereignisse sind, (b) eine örtliche und zeitliche Dissemination des Krankheitsprozess entsprechend der McDonald-Diagnosekriterien vorliegt (Nachweis i.d.R. mittels MRT) und (c) mögliche Differentialdiagnosen ausgeschlossen wurden (28).

### 1.2.1 Überblick zur Ätiologie und Pathogenese der MS

#### *Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umwelteinflüssen*

Die definitiven Ursachen für die Entstehung von MS sind nach wie vor unklar. Vermutet wird, dass die Krankheit zur Ausprägung kommt, wenn bei Vorliegen einer entsprechenden genetischen Suszeptibilität unterschiedliche Umweltfaktoren einwirken. Etwa ein Drittel des Gesamtrisikos für MS wird dem Einfluss genetischer Varianten zugeschrieben, die hauptsächlich Bezug zu Funktionen des Immunsystems haben (z.B. erhöhtes Risiko bei bestimmte HLA-Haplotypen oder bei Polymorphismen in Genen, die für Zytokin-Rezeptoren wie IL2R und IL7R kodieren) (26, 29).

Zu den etablierten umweltabhängigen Risikofaktoren werden die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV), Rauchen und geringe Vitamin D-Spiegel gezählt. Überdies werden Übergewicht während der Adoleszenz, ein gestörter zirkadianer Rhythmus sowie eine Dysbalance des Mikrobioms als mögliche Risikofaktoren berichtet (30). Zudem wird der Geschlechtsbias von Autoimmunerkrankungen im Allgemeinen und von der RRMS im Besonderen auf X-chromosomale Effekte (z.B. genetisches Imprinting, inkomplette X-Inaktivierung) und die Wirkung von Sexualhormonen zurückgeführt (31, 32).

### *Pathogenese*

Die Pathogenese der MS ist geprägt von einer multizellulär-vermittelten Inflammation. Anfänglich ist diese v.a. auf lokale Läsionen in der weißen und grauen Hirnsubstanz begrenzt und infiltrierende Immunzellen führen durch direkte Zellkontakte und Entzündungsmediatoren zu Demyelinisierung, Apoptose von Oligodendrozyten und neuroaxonale Schäden. Später im Krankheitsverlauf gewinnen progrediente neurodegenerative Prozesse an Bedeutung, welche durch eine diffus verteilte Inflammation angetrieben werden. Aufgrund unvollständig bekannter Auslöser bleibt umstritten, ob die initiale Aktivierung der beteiligten Immunzellen in der Peripherie oder innerhalb des ZNS ihren Ausgang nimmt. Das Konzept des ZNS als immunprivilegiertes Organ bestärkt die Hypothese der peripheren Aktivierung, bei der autoreaktive Lymphozyten auf Grundlage gestörter Selbsttoleranz-Mechanismen in den peripheren Lymphknoten aktiviert werden (z.B. beeinträchtigte periphere Toleranz durch Bystander-Aktivierung, molekulares Mimikry oder defekte regulatorische T-Zellen), ins ZNS migrieren und dort von bereits vorhandenen Makrophagen und DCs reaktiviert werden. Im Kontrast hierzu steht die ZNS-intrinsische Initiation durch noch unbekannte Auslöser. Patrouillierende Memory-T-Zellen im Liquor oder ZNS-residente Astrozyten und Mikroglia könnten etwa die intrinsische Inflammation im ZNS initiieren, welche dann die Rekrutierung peripherer autoreaktiver Lymphozyten nach sich zieht (extrahiert aus den Übersichtsarbeiten (26, 33)).

Autoreaktiven T-Zellen, insbesondere CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wird eine zentrale Rolle in der Pathogenese der MS zugeschrieben. Sie finden sich bereits in den frühen entzündlichen MS-Läsionen (34). Entscheidende proinflammatorische Funktionen üben dabei die CD4<sup>+</sup> T-Zellen Subsets Th1- und Th17-Zellen aus, wobei umstritten ist, welches Subset den größeren Einfluss hat (35). Nicht eindeutig geklärt sind die spezifischen ZNS-Autoantigene, die CD4<sup>+</sup> T-Zellen und andere autoreaktive Lymphozyten aktivieren. Myelin-assoziierte Antigene wie das Myelin basische Protein (MBP) oder das Myelin-Oligodendrozyten Protein (MOG) wurden intensiv untersucht, ein direkter Nachweis bleibt jedoch nach wie vor schwierig (36). Im Vergleich zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen finden sich CD8<sup>+</sup> T-Zellen in höherer Anzahl in den MS-Läsionen. Es wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen MHC-I-vermittelte axonale Schäden verursachen können (35). Auch B-Zellen wird eine

pathogenetische Bedeutung zugeschrieben, etwa als Produzenten von Antikörpern mit MOG-Spezifität, die intrathekal und in MS-Läsionen nachgewiesen wurden, sowie aufgrund der Modulation der T-Zell-Proliferation durch Zytokine und ihrer Rolle als antigen-präsentierende Zellen (37). Immer größere Aufmerksamkeit erhalten zudem angeborenen Immunzellen wie die ZNS-residente Mikroglia und Astrozyten, aber auch infiltrierende Monozyten, DCs und NK-Zellen, die sowohl durch pro- als auch antiinflammatorische Funktionen die MS-Pathogenese beeinflussen (38).

### 1.2.2 Rolle der NK-Zellen in der Pathogenese von EAE und MS

Wie bereits erwähnt wurde NK-Zellen sowohl ein protektives als auch destruktives Potential in autoimmunen Prozessen zugesprochen (25). Im Fall der MS deutet der überwiegende Teil der Ergebnisse auf eine immunregulatorische Rolle der NK-Zellen hin (Übersicht in (22, 39)).

#### *Hinweise aus dem EAE-Modell*

Studien im EAE-Modell haben widersprüchliche Ergebnisse produziert, nach denen die Depletion von NK-Zellen entweder zu einer verringerten oder verstärkten EAE-Aktivität führt (zusammengefasst (40)). Dennoch lassen sich aus den beteiligten Mechanismen Rückschlüsse auf die potentielle Pathogenese ableiten. In einem IL-18-Knockout-Modell ließen sich nur bei Anwesenheit von IFN- $\gamma$  produzierenden NK-Zellen IL-18-abhängig EAE-Symptome induzieren (41). Die Bedeutung der NK-Zellen für die Regulation der ZNS-intrinsischen Inflammation zeigte sich in CX3CR1<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen. CX3CR1 ist ein Chemokin-Rezeptor, der für die Migration von NK-Zellen in das ZNS erforderlich ist (42). CX3CR1<sup>-/-</sup> defizienten Mäusen entwickelten einen schweren Verlauf der EAE, was v.a. allem mit einer verminderten Rekrutierung reifer NK-Zellen ins ZNS assoziiert war (43). Ihre protektive, regulatorische Funktion innerhalb der ZNS-Inflammation in der EAE üben NK-Zellen mittels direktem zytotoxischem Killing von autoreaktiven T-Zellen (44) und Suppression residenter Mikroglia aus (45). Hierfür relevant scheint u.a. die Interaktion zwischen dem inhibitorischen NKG2A und dessen Liganden Qa-1 (murines Äquivalent für HLA-E). Die Blockade der Interaktion führte zu einer verstärkten NK-Zytotoxizität gegenüber T-Zellen und Mikroglia und zur verminderten ZNS-Inflammation (45).

Inwieweit NK-Zellen an der Neuroinflammation mitwirken oder diese begrenzen, scheint u.a. abhängig vom lokalen Zytokinmilieu (46). Aber auch die Phase der Erkrankung könnte entscheidend sein. So wurde für die chronische, späte Phase der EAE eine vermehrte zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber neuronalen Stammzellen (NSC) in der subventrikulären Zone nachgewiesen (47). Entsprechend ist denkbar, dass NK-Zellen einerseits die anfänglich akute Entzündung durch Suppression autoreaktiver Zellen begrenzen,

andererseits chronisch neurodegenerative Prozesse durch Störung der Reparaturmechanismen befeuern (22).

### *NK-Zellen in der Pathogenese der MS*

Humane NK-Zellen können autologe Oligodendrozyten nach Aktivierung mit IL-2 in vitro abtöten (48). Dieser Prozess wurde als NKG2D-abhängig beschrieben (49). Auch wenn hieraus das Potential von NK-Zellen abgeleitet wurde, im inflammatorischen Milieu aktiver MS-Läsion an der Gewebedestruktion beteiligt zu sein (48, 49), deuten die meisten Studien eher auf eine Störung der Funktionen von NK-Zellen bei MS hin. In der Tat zeigen NK-Zellen von MS-Patienten keine gesteigerte, sondern eine reduzierte Zytotoxizität in funktionellen Assays (39), die mit radiologischer und klinischer MS-Aktivität assoziiert wurde (50, 51). Kastrukoff et al. identifizierten in longitudinalen Studien mehrwöchige Episoden defizienter zytotoxischer NK-Zell-Aktivität, welche in zeitlicher Korrelation zum Auftreten klinischer Schübe und der Zunahme aktiver Läsionen im MRT standen (51). Diese Phasen erhöhter Suszeptibilität für MS-Aktivität, so die Autoren, seien das Resultat einer gestörten NK-Zytotoxizität gegenüber ihren Zielzellen (52).

Ähnliche Hinweise geben die von Takahashi et al. durchgeführten Studien weitere Hinweise (53, 54). Periphere NK-Zellen von MS-Patienten in Remission wiesen einen CD95<sup>high</sup> (Fas) Phänotyp auf, der mit erhöhter Produktion antiinflammatorischen IL-5 und der Kapazität verbunden war, die Antwort IFN- $\gamma$  produzierende Th1-Zellen direkt zu supprimieren. Erstaunlicherweise verloren die NK-Zellen während eines akuten Schubs diesen regulatorischen Phänotyp. Die Ergebnisse unterstreichen den protektiven Einfluss regulatorischer NK-Zellen, deuten jedoch auch darauf hin, dass in Phasen akuter MS-Aktivität eine eingeschränkt suppressive Kapazität regulatorischer NK-Zellen zur überschießenden Immunantwort autoreaktiver Zellen beitragen könnte.

In diesem Zusammenhang stellen sich zwei Fragen: Welcher NK-Zell-Phänotyp wirkt protektiv auf die pathogenetischen Vorgänge ein? Über welche NK-Zielzell-Interaktionen und Mechanismen wird diese Protektion gewährleistet?

Aufgrund ihrer regulatorischen Kapazität wurden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als Suppressoren von Autoimmunität propagiert (55). Nicht zuletzt die Beobachtungen, dass verschiedene MS-Therapien, insbesondere der monoklonale Antikörper Daclizumab, zu einer Expansion und gesteigerten Zytotoxizität der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen führen, bestärkten die Annahmen zu einer potentiell protektiven Rolle dieses NK-Zell-Subsets (Review in (39)). Beobachtungsstudien zur Frequenz von CD56<sup>bright</sup> im peripheren Blut bei MS sind jedoch nicht eindeutig. De Jager et al. beschrieben eine Reduktion der Frequenz von CD8<sup>low</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD4<sup>-</sup> Zellen bei RRMS und interpretierten diese Zellpopulation als potentiell regulatorische NK-Zellen (56). Infante-Duarte et al. fanden unreife CX3CR1<sup>-</sup> NK-Zellen (einem Phänotyp, der typisch für CD56<sup>bright</sup> ist) bei

stabiler MS erhöht vor, wohingegen diese Zellen in klinisch aktiven Phasen reduziert und CX3CR1<sup>+</sup> NK-Zellen erhöht waren (57). Andere Studien konnten keine Veränderung in der Frequenz des CD56<sup>bright</sup> Subsets bei MS nachweisen, berichteten jedoch funktionelle Defizite in dieser NK-Zell-Population (58, 59). So zeigten Lünemann et al. eine deutlich eingeschränkte Proliferation und IFN- $\gamma$ -Produktion von CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen bei RRMS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (58).

Als Ziel der suppressiven NK-Zell-Aktivität kommen grundsätzlich verschiedene adaptive und angeborene Immunzellpopulationen in Betracht (siehe Kapitel 1.1.3). Neuere Publikationen fokussierten v.a. auf unterschiedliche Mechanismen, mittels derer NK-Zellen aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen supprimieren (Review in (22)). Eine Übersicht zu den Mechanismen der NK-T-Zell-Interaktion und ihrer Relevanz bei MS findet sich in Tabelle 1.

Zwei Studien zur suppressiven Kapazität der NK-Zellen bei MS wiesen auf Störungen in der NK-T-Zell-Interaktion hin. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen zeigten Laroni et al. eine signifikant reduzierte Kapazität der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen von MS-Patienten die Proliferation von autologen T-Zellen zu inhibieren (59). Die Autoren identifizierten als möglichen Mechanismus dieses Defizits eine verstärkte Inhibition der CD56<sup>bright</sup> über die Interaktion zwischen inhibitorischem NKG2A und dessen Ligand HLA-E. Bei phänotypisch unveränderten NK-Zellen war die HLA-E-Expression auf den T-Zellen der Patienten erhöht. Durch die Blockade der HLA-I-Moleküle der T-Zellen wurde die Funktionsfähigkeit der NK-Zellen wiederhergestellt. Gross et al. berichteten (60), dass NK-Zellen von MS-Patienten durch eine deutlich geringere Expression des aktivierenden Rezeptors DNAM-1 (DNAX accessory molecule-1) sowie eine reduzierte zytotoxische Aktivität gegenüber aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen charakterisiert waren. Gleichzeitig regulierten die T-Zellen der MS-Patienten bei Aktivierung den DNAM-Ligand CD155 in verringerten Maß hoch, was diese weniger anfällig für zytotoxisch Attacken der NK-Zellen machte. Beide Studien zeigen, die Kontrolle der autologen T-Zellen durch NK-Zellen ist bei MS beeinträchtigt. Ursächlich hierfür scheint weniger eine NK-intrinsischer Defekt als vielmehr eine T-Zell-Resistenz gegenüber der Zytotoxizität von NK-Zellen zu sein (22).

**Tabelle 1.** NK-Zell-vermittelte Kontrolle von T-Zellen.

<b>Involvierte NK-Zell-Rezeptoren/Moleküle</b> (NK-Subset)	<b>Effekt auf aktivierte, autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen</b>	<b>Notwendige Stimuli für NK-Zellen</b>	<b>Rolle bei MS</b>
<b>NKG2D</b> <b>CD94/NKG2A</b> (CD56 <sup>dim</sup> /CD56 <sup>bright</sup> ) (11)	NK-Zell-Zytotoxizität (verstärkt durch NKG2A-Blockade)	IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IFN- $\alpha$ (IL-7, IL-21 nur bei CD56 <sup>bright</sup> )	Verstärkte Inhibition der CD56 <sup>bright</sup> über NKG2A-HLA-E-Interaktion (59)
<b>DNAM-1</b> (CD56 <sup>dim</sup> /CD56 <sup>bright</sup> ) (60)	NK-Zell-Zytotoxizität	IL-2	DNAM-1-CD155-Interaktion zw. NK-Zellen und T-Zellen beeinträchtigt, Wiederhergestellt durch Daclizumab (60)
<b>Granzym K</b> (CD56 <sup>bright</sup> ) (61)	NK-Zell-Zytotoxizität (Caspase-unabhängig)	Anti-IL2-R $\alpha$ , IL-2	Verstärkt durch Daclizumab (61)
<b>NKp30</b> <b>NKp46</b> (CD56 <sup>bright</sup> ) (59)	NK-Zell-Zytotoxizität (via Granzym B) Anti-proliferativer Effekt	IL-12, IL-15	Nicht beeinträchtigt (59)
<b>Adenosin</b> (CD56 <sup>bright</sup> ) (62)	Anti-proliferativer Effekt		Nicht bekannt
<b>Perforin</b> (CD56 <sup>bright</sup> ) (63)	Anti-proliferativer Effekt	IL-27	Nicht bekannt

Die Darstellung in dieser Tabelle orientiert sich am Übersichtsartikel von Gross et al. (22).

Die meisten Erkenntnisse zu NK-Zellen bei MS basieren auf Untersuchungen des peripheren Bluts. Es liegen jedoch auch Hinweise für einer regulatorischen Rolle der NK-Zellen direkt innerhalb der autoimmunen ZNS-Inflammation vor. Intrathekal bilden CD56<sup>bright</sup> sowohl bei gesunden Kontrollen als auch bei MS-Patienten die vorherrschende NK-Population (60, 64). CD56<sup>bright</sup> weisen dabei eine höhere Kapazität auf, über die Blut-Hirn-Schranke zu migrieren (60), und könnten zusätzlich über die lymphatischen Gefäße des ZNS einwandern (22). In aktiven MS-Läsionen fanden sich Granzym K<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> NK-Zellen, suggestiv für einen CD56<sup>bright</sup> Phänotyp, in unmittelbarer Nachbarschaft zu T-Zellen, was einen regulatorischen Einfluss dieser Zellen nahelegt (60). Zusätzlich konnten in MS-Plaques eine Hochregulierung von HLA-E beobachtet werden, die mit einer beeinträchtigten zytotoxische NK-Zell-Aktivität einherging (65). Entsprechend ist eine gestörte Immunregulation durch NK-Zellen in der ZNS-intrinsischen MS-Pathogenese denkbar.

Im Hintergrund der NK-Zell-Studien bei MS steht die grundsätzliche Frage, welche Mechanismen eine Protektion vor Autoimmunität vermitteln können. Erkenntnisse zur Beeinträchtigung der immunregulatorischen NK-Zell-Funktionen bei MS-Patienten und Patientinnen deuten auf eine protektive Rolle der NK-Zellen in der MS-Pathogenese. Es zeigt sich jedoch auch, dass der Einfluss der NK-Zellen wesentlich von der Erkrankungsphase, dem lokalen, gewebespezifischen Mikromilieu und dem jeweiligen NK-Subset abhängen könnte. Zeitgleich wird die phänotypische Diversität der humanen NK-Zell-Populationen zunehmend bekannt, die es in ihrer physiologischen und pathogenetische Bedeutung zu verstehen gilt (13). Die bisherigen NK-Zell-Studien bei MS fokussierten allerdings gar nicht oder begrenzt auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> auf unterschiedliche Subsets, häufig in einem querschnittlichen Studienansatz. Weitere Studien sind daher notwendig, um die spezifische NK-Zell-Populationen zu bestimmen, die mit klinischer MS-Aktivität und Inaktivität assoziiert sind, und somit die Grundlage für ein besseres mechanistisches Verständnis der MS und der potentiellen Targets für die Immuntherapie zu schaffen.

### **1.3 Endogene Immuntoleranz während der Schwangerschaft**

Die Schwangerschaft stellt eine Herausforderung für das maternale Immunsystem dar. Zum einen gilt es Immunreaktionen gegen Alloantigene des Fetus effektiv zu unterdrücken; zum anderen muss hierbei die Immunkompetenz der Mutter gegenüber Pathogenen erhalten bleiben. Durch eine komplexe Immunmodulation – „vor Ort“ an der fetomaternalen Barriere der Plazenta und „systemisch“ bezüglich der Antwort des peripheren Immunsystems – wird ein Zustand der endogenen Immuntoleranz erreicht. Hieraus ergeben sich Konsequenzen für die maternale Immunantwort auf Pathogenen aber auch auf Selbst-Antigene.

### 1.3.1 Grundkonzept zum Immunsystem während der Schwangerschaft

Dem „Allograft“-Paradigma folgend wurden Fetus und Placenta lange Zeit mit einem Organtransplantat verglichen, welches jedoch keine Abstoßungsreaktion auslöst. Das immunologische Paradoxon wurde zum einen durch die Immunevasion der fetalen Antigene und zum anderen durch eine globale Suppression des maternale Immunsystems erklärt (66, 67).

Im gegenwärtigen immunologischen Paradigma wird die Schwangerschaft von einem „komplexen Netzwerk der Immunmodulation“ gekennzeichnet, in welchem die Immuntoleranz gegenüber fetale Antigene Folge einer kooperativen Interaktion zwischen Mutter und Fetus ist (67). Die folgenden Aspekte prägen das maternale Immunsystem:

*Fetale Antigene werden durch das maternale Immunsystem erkannt.* Entgegen dem Konzept der Immunevasion verursachen fetale Antigene die Bildung antigenspezifischer T<sub>reg</sub>-Zellen (68). Es existieren verschiedene Kontakte zwischen Mutter und Fetus, die eine Antigenerkennung ermöglichen. An der fetomaternalen Kontaktfläche (engl. fetomaternale interface) der Plazenta treten fetal Trophoblastenzellen mit den maternalen Immunzellen in Kontakt, sowohl in Form des die Dezidua infiltrierenden extravillösen Trophoblasten (EVT), als auch in Gestalt des villöse Trophoblasten, welcher die Plazentazotten auskleidet und somit in Kontakt maternalen Immunzellen der Blutzirkulation steht. Über diesen lokalen Kontakt im Uterus hinaus werden Mikropartikel des Trophoblasten in das maternale Blut freigesetzt und fetale Zellen migrieren aktiv durch Zirkulation und Gewebe der Mutter (69).

*Die Toleranz gegenüber fetalen Antigenen ist Resultat aktiver Immunregulation sowohl lokal an der fetomaternalen Kontaktzone als auch systemisch im maternalen Immunsystem.* Neben der Restriktion der Expression klassischer MHC-Moleküle auf dem Trophoblasten (69) tragen maternale und fetale Zellen zur Etablierung eines tolerogenen Umgebung in der Plazenta bei (70). Systemisch wirken eine Vielzahl von immunmodulatorischer Mechanismen zusammen – von zirkulierenden Hormonen bis hin zu regulatorischen Zellen des angeborenen und adaptiven maternalen Immunsystems (siehe Kapitel 1.4.2). Es wird vermutet, dass derartige Anpassungsmechanismen des maternalen Immunsystems an die plazentare Schwangerschaft als Produkt des hohe evolutionären Selektionsdruck auf die Reproduktion zustande gekommen sind (71).

*Je nach Phase der Schwangerschaft dominiert pro- oder antiinflammatorische Prozesse.* Implantation und Plazentation sind geprägt von Gewebezerstörung und Umbauprozesse. Diese Vorgänge werden durch eine starke proinflammatorische Antwort unterstützt, welche das Immunsystem und klinische Befinden der Mutter im ersten Trimester der Schwangerschaft bestimmen. Im zweiten Trimester stellt sich eine symbiotische Beziehung zwischen Mutter und wachsenden Fetus ein, in welcher antiinflammatorische Prozesse vorherrschen. In Vorbereitung

auf den Geburtsvorgang werden im dritten Trimester Immunzellen in das Myometrium rekrutiert und eine erneute Inflammation stimuliert. Die präzise und dynamische Regulation pro- und antiinflammatorischer Signale ist essentiell für eine erfolgreiche Schwangerschaft (67).

*Die veränderte Immunantwort auf Infektionen ist der Immunmodulation während der Schwangerschaft geschuldet.* Schwangere Frauen zeigen für bestimmte Infektionen eine erhöhte Suszeptibilität (z.B. Malaria) bzw. einen schwereren Krankheitsverlauf (z.B. Influenza) (72).

#### *Toleranzmechanismen des fetomaternalen Interface*

Im Detail am besten verstanden, sind die Vorgänge in der Dezidua, die reich an maternalen Immunzellen ist (73). Neben Makrophagen, dendritischen Zellen und T-Zellen bilden CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen mit 70% die größte Population unter den Immunzellen (74). Die dezidualen NK-Zellen steuern v.a. die Trophoblasten-Invasion und die anschließende Vaskularisierung der Plazenta (75). Die Interaktion der dezidualen NK-Zellen mit dem EVT wird über die polymorphen HLA-C1/2 und nicht-klassische HLA-E und HLA-G etabliert (69). Anscheinend sind die deziduale NK-Zellen jedoch nicht essentiell für die Etablierung der fetomaternalen Toleranz in utero (76).

Eine zentrale Rolle in der Suppression anti-fetaler Immunität wird den lokalen T<sub>reg</sub>-Zellen der Plazenta zugeschrieben. Sie expandieren während der frühen Schwangerschaft in der humanen Dezidua (77) und eine Depletion dieser Zellen im Mausmodell verhindert die allogene aber nicht die syngene Schwangerschaft (78).

Das tolerogene Milieu der fetomaternalen Kontaktzone wird von einer Vielzahl von exprimierten und sezernierten Faktoren geprägt (ausführlich beschrieben in (73)). Diese werden von fetalen und maternalen Zellen produziert. Beispielsweise exprimiert der villöse Trophoblast den Fas-Liganden, was einen potentiellen Mechanismus darstellt, über den die Migration von aktivierte anti-fetale T-Zellen in den Fetus verhindert werden kann. Gal1 auf uterinen NK-Zelle induziert toleranzfördernde dendritische Zellen. TGF- $\beta$  undIDO (Indoleamine 2,3-dioxygenase) stimulieren u.a. Zytokine der Th2-dominierten Immunantwort im Uterus.

## **1.4 Immunregulatorische Mechanismen während der Schwangerschaft bei MS**

Die schwangerschafts-induzierte Immuntoleranz wirkt sich auch auf die autoimmune Inflammation aus. Die Krankheitsaktivität vieler Autoimmunerkrankungen verringert sich in der Schwangerschaft (z.B. MS und RA) (79). Während die lokalen Toleranzmechanismen unerlässlich für den Erfolg der Schwangerschaft sind, scheinen die systemischen Veränderungen

der maternalen Immunität jedoch für den protektiven Effekt auf die Autoimmunität relevanter zu sein (32).

#### **1.4.1 Protektion vor klinischer Aktivität während der Schwangerschaft bei MS**

Die Schwangerschaft bei MS geht mit einer temporären Reduktion der Krankheitsaktivität um 70-80% (je nach Studie) einher, gefolgt von einem „rebound“-artigen Anstieg der MS-Aktivität in der postpartalen Phase. Confavreux et al. (80) zeigten in einer multinationalen Studie mit 254 Patientinnen, dass sich die jährliche Schubrate von 0,7 (Schübe pro Frau/Jahr) vor der Schwangerschaft auf 0,2 im dritten Trimester der Schwangerschaft reduzierte. Innerhalb der ersten 3 Monate postpartal stieg die Schubrate auf 1,2 pro Frau pro Jahr einem Rebound-Phänomen ähnlich über das Level der Krankheitsaktivität vor der Schwangerschaft an, um sich diesem anschließend wieder anzugleichen. Diese Ergebnisse wurden in einer Metaanalyse von insgesamt 13 epidemiologischen Studien zur MS-Aktivität vor, während und nach der Schwangerschaft durch Finkelsztejn et al. hoch-signifikant bestätigt (81). Der protektive Effekt der MS-Schwangerschaft ist auch deshalb beeindruckend, weil der therapeutische Effekt etablierter MS-Medikamente mit einer Schubreduktion um 30-60% deutlich übertroffen wird (32).

#### **1.4.2 Systemische Anpassungen der maternalen Immunität während der Schwangerschaft**

Die biologischen Mechanismen, welche die Protektion während der Schwangerschaft bei MS vermitteln, sind kaum verstanden. Da die Schwangerschaft bei anderen Autoimmunerkrankungen auch mit einer gesteigerten Entzündungsaktivität einhergehen kann (z.B. SLE) (79), ist eine ubiquitär wirkende Immunsuppression unwahrscheinlich. Stattdessen wird vermutet, dass die Veränderung der autoimmunen Aktivität als Nebeneffekt der komplexen Modulation des maternalen Immunsystems auftritt (82), abhängig davon ob sich die regulativen Mechanismen günstig oder ungünstig auf die jeweilige autoimmune Pathogenese auswirken. Aktuell werden verschiedene Aspekte der systemischen Immunmodulation als relevant für die Schwangerschaft bei MS diskutiert (Review in (32, 82, 83)).

##### *Systemische Zytokin-Shifts*

Nach dem Th1/Th2-Paradigma kommt es in der Schwangerschaft zur Verschiebung hin zu einer Th2-dominierten Antwort im peripheren Immunsystem. Dieser Th2-Shift wurde lange Zeit als zentraler Mechanismus herangezogen, um die klinische Besserung der von Th1- und Th17-Zellen geprägten Autoimmunerkrankungen wie MS sowie die verstärkte Krankheitsaktivität bei Th2-Zell-dominierten Erkrankungen wie dem SLE zu erklären (84). In mehreren longitudinalen Studien

konnte der Shift von einer Th1- zu einer antiinflammatorischen Th2-Antwort im peripheren Blut schwangerer MS-Patientinnen auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden (siehe Übersicht in (83)). Während der Th2-Shift vor allem die systemische Immunantwort ab dem zweiten Schwangerschaftstrimester zu betreffen scheint, erklärt eine generellen, antiinflammatorischen Th2-Antwort jedoch kaum die nuancierten Immunmodulation in der Schwangerschaft (82).

#### *Hormonelle Immunregulation*

Die erhöhten Spiegel systemisch zirkulierender Hormone während der Schwangerschaft stellen den wohl am besten untersuchten Erklärungsansatz für die Reduktion der MS-Krankheitsaktivität dar. Die Sexualsteroiden Östrogen und Progesteron; sowie Cortisol und Prolaktin stimmen hinsichtlich ihres Anstiegs in der Schwangerschaft und einem raschen Abfall postpartal mit den dynamischen Veränderungen der klinischen Aktivität der MS während und nach der Schwangerschaft überein (82). Sie verfügen über potente immunmodulatorische Eigenschaften, die in (85) dargestellt wurden.

Im Fall von Östrogen ist bereits eine erfolgreiche Translation in klinischen Studien gelungen (Überblick in (83)). In einer multizentrischen, randomisiert-kontrollierten Studie (RCT), die eine Estrioldosis vergleichbar mit den Estriol-Leveln zur Mitte der Schwangerschaft verwendete, wurde eine um 37% reduzierte jährliche Schubrate in der Estriol-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Add on mit Glatirameracetat) beobachtet (86). Allerdings bildet die therapeutische Gabe von Estriol die schwangerschafts-assoziierte Schubreduktion nur unvollständig nach, sodass weitere protektive Mechanismen in der Schwangerschaft notwendig sind (83).

#### *Schwangerschaftsabhängige T-Zell-Antwort*

Systemische Hormone und Th2-Zytokine machen die breiten, nicht-selektiven Komponenten der Immunmodulation in der Schwangerschaft aus. Zunehmend werden jedoch auch die zell- und antigenspezifischen Vorgänge bekannt.

Für die murine und humane Schwangerschaft im Gesunden wurde ein ansteigender Anteil zirkulierender  $T_{reg}$  mit Maximum zur Mitte der Schwangerschaft und postpartaler Reduktion berichtet (78, 87). Neuere Beobachtungen dazu, dass die stark suppressiven  $CD4^{dim} CD25^{hi} T_{reg}$  im zweiten Trimester bei gesunden Schwangeren vermindert sind (88), und inkonsistente Ergebnisse in Studien zur Schwangerschaft bei MS erschweren jedoch eine sichere Aussage (Übersicht in (82)). Während dieses uneinheitliche Bild vermutlich z.T. durch abweichende  $T_{reg}$ -Definitionen begründet ist, könnte in den  $T_{reg}$  dennoch ein Schlüssel zur antigenspezifischen

Toleranz liegen. Die Existenz zirkulierender alloantigen-spezifischen  $T_{reg}$  wurde in der murinen und humanen Schwangerschaft nachgewiesen (68, 89). Dass diese zur Wiederherstellung der Toleranz gegenüber Autoantigenen beitragen könnten, zeigt u.a. eine Studie im Mausmodell der autoimmunen Arthritis. Mittels des adoptiven Transfers der  $T_{reg}$  von schwangeren Mäusen konnten in nicht-schwangeren Mäusen eine Protektion vor autoimmuner Arthritis erzeugt werden (90). Kürzlich publizierte Erkenntnisse rücken zudem die Modulation des T-Zell-Repertoire in den Fokus (91). Die Schwangerschaft bei MS führt hiernach zu einer Reduktion der T-Zell-Klonalität, d.h. einige wenige, patientenspezifische Klone, die vor der Schwangerschaft dominierten, werden herunterreguliert und das Repertoire verteilte sich gleichmäßiger auf viele Klone.

Ob diese Prozesse jedoch tatsächlich Einfluss auf die autoimmune Aktivität gegen MS-spezifische Antigene haben, muss noch geklärt werden. Darüber hinaus stellt sich die Frage, welche Treiber die Induktion von alloantigen-spezifischen  $T_{reg}$  aber auch die Modulation der T-Zell-Klone während der Schwangerschaft bedingen.

#### *Expansion der regulatorischen $CD56^{bright}$ NK-Zellen*

In dieser Frage könnten u.a. die NK-Zellen von Bedeutung sein, die über die Fähigkeit verfügen, das T-Zell-Kompartiment direkt und indirekt (über DCs) zu regulieren (siehe Kapitel 1.1.3). Entsprechend relevant sind die Ergebnisse der finnischen Studie von Airas et al. (92, 93), nach denen die regulatorischen  $CD56^{bright}$  NK-Zellen in der Zirkulation schwangerer MS-Patientinnen expandieren. Untersucht wurden 42 MS-Patientinnen längsschnittlich während der Schwangerschaft und der postpartalen Phase. Für die  $CD56^{bright}$  NK-Zellen (sowohl  $CD16^{-}$  als auch  $CD16^{+}$ ) wurde ein signifikanter Frequenzanstieg im dritten Trimester im Vergleich zur frühen Schwangerschaft beobachtet, gefolgt von einer Reduktion postpartal. Dies war assoziiert mit einer verminderten MS-Aktivität während der Schwangerschaft, verdeutlicht durch eine signifikant verringerten jährlichen Schubrate im dritten Trimester. Gleichzeitig zeigte sich eine Reduktion der  $CD56^{dim}$  NK-Zellen während der Schwangerschaft. Überdies bemerkenswert ist, dass die beschriebenen NK-Zell-Shifts vermutlich eine allgemeine schwangerschaftsbezogene Anpassung ausmachen, die nicht nur bei MS-Patientinnen, sondern auch bei den ebenfalls in der Studie untersuchten gesunden Schwangeren beobachtet werden konnte.

Die Studienlage zu den NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS ist darüber hinaus sehr gering. Lediglich zwei weitere Studien ergänzen das Bild zu den  $CD56^{bright}$  NK-Zellen (94, 95). Die Autoren konnten für  $CD56^{bright} CD16^{-}$  NK-Zellen einen signifikanten Anstieg der Zellfrequenz in der Gruppe gesunder Schwangerer im dritten Trimester nachweisen. Eine derartige Erhöhung konnte jedoch nicht für schwangere MS-Patientinnen bestätigt werden. Wichtig zu bemerken ist, dass die Studien einerseits einen querschnittlichen Ansatz verfolgten und andererseits von der  $CD56^{bright}$  Definition nach Airas et al. abwichen. Unter Beachtung der uneinheitlichen und

geringen Studienlage kann vorerst v.a. festgehalten werden, dass der beschriebene NK-Zell-Shift vermutlich eine allgemeine Anpassung der Schwangerschaft bei Gesunden ausmacht (gezeigt auch von Airas et al. (92)).

Die Rolle der NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS bedarf hingegen einer Untersuchung in weiteren Studien. Dies ist aus zweierlei Hinsicht relevant. Zum einen sind die biologischen Mechanismen, die den protektiven Effekt der Schwangerschaft auf die Autoimmunität vermitteln, bisher unzureichend verstanden – eine Fragestellung, die in direktem Bezug zu der weit grundsätzlicheren Frage steht, was Protektion vor Autoimmunität bedingt. Zum anderen können die in Kapitel 1.2.2 aufgeworfenen Fragen zur Rolle der NK-Zellen in der MS-Pathogenese (u.a. zu spezifischen NK-Zell-Populationen und den Details der NK-vermittelten Regulation) in Studien zur Schwangerschaft bei MS optimal aufgegriffen werden, da die Schwangerschaft aufgrund des raschen Wechsel zwischen autoimmuner Inaktivität und Aktivität ein informatives wissenschaftliches Paradigma zur Erforschung von Mechanismen der Immuntoleranz bildet (beschrieben in (91)).

## 2 Zielsetzung

NK-Zellen verfügen über die Fähigkeit autoimmune Inflammation einzudämmen und wurden daher als protektiver Akteur in der MS propagiert. Die Defizienz ebendieser regulatorischen Funktion von NK-Zellen scheint jedoch ein ‚Hallmark‘ der MS-Pathogenese zu sein. Welche Mechanismen hierbei beeinträchtigt sind und welcher NK-Zell-Phänotyp im Detail protektiven Einfluss ausübt, ist nicht abschließend geklärt. In diesem Zusammenhang könnte die Schwangerschaft als einzigartiges Forschungs-Paradigma fungieren. Die erhebliche Reduktion der MS-Schubrate während der Schwangerschaft scheint Ausdruck einer endogenen Immunregulation mit substantiell protektivem Einfluss auf die maternale Autoimmunität zu sein. Die zugrundeliegenden biologischen Mechanismen dieser Protektion sind jedoch weitgehend unbekannt. Obwohl die Expansion regulatorischer CD56<sup>bright</sup> während der MS-Schwangerschaft als möglicher protektiver Faktor beschrieben wurde, fehlen Studien, die diese Beobachtung bestätigen und abseits der reinen Enumeration der klassischen NK-Zell-Populationen detaillierte Informationen zu NK-Zellen während der MS-Schwangerschaft liefern.

In dieser Arbeit sollte daher ein Beitrag zum Verständnis der biologischen Mechanismen des protektiven Effekts der Schwangerschaft auf die MS-Aktivität geleistet werden. Das übergeordnete Ziel bestand in der Untersuchung des NK-Zell-Phänotyps während und nach der Schwangerschaft bei MS-Patientinnen auf Basis der folgenden *Hypothese*:

*Die Schwangerschaft induziert bei MS-Patientinnen die Veränderungen der NK-Zellen hin zu einem regulatorischen Phänotyp.*

Mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie sollten in einer zeitlich engmaschigen verfolgten, longitudinalen Pilotstudie folgende Teilaspekte analysiert werden:

- 1) Ermittlung der Frequenz der Gesamt- sowie der CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen
- 2) Explorative Charakterisierung des Phänotyps von CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bezüglich der Expression von aktivierender und inhibierender NK-Zell-Rezeptoren, Chemokinrezeptoren sowie Maturationsmarkern
- 3) Korrelation des NK-Zell-Phänotyps mit der radiologischen Krankheitsaktivität

Die Ergebnisse dieser explorativen Studien sollen überdies das Verständnis der Immunpathogenese der MS sowie neue zielgerichtete Therapieansätze unterstützen.

## 3 Material und Methodik

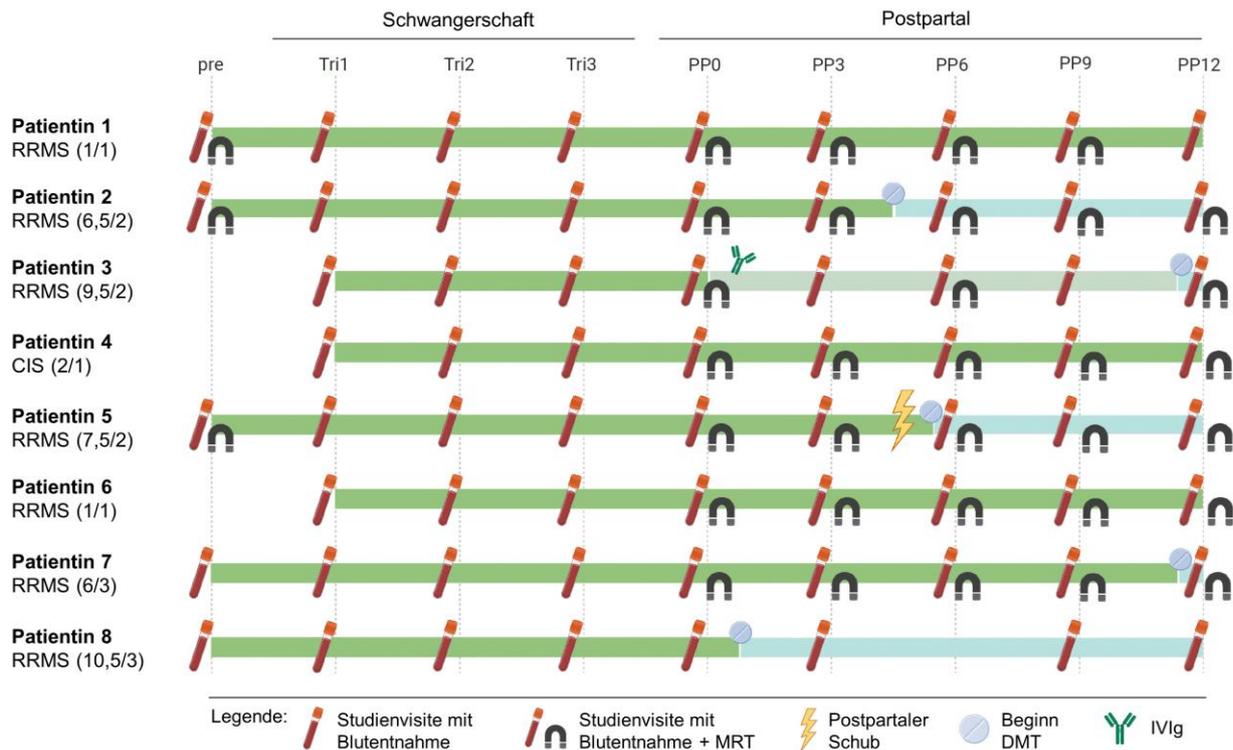
### 3.1 Patientinnen

#### 3.1.1 Überblick zur Schwangerschaftskohorte

Die Patientinnen wurden im Rahmen der Studie „Datenbank zur Familienplanung und Schwangerschaften bei Multipler Sklerose“ (PreCoMS) durch Studienärzte der AG Klinische Neuroimmunologie des NeuroCure Clinical Research Center (NCRC), Charité Universitätsmedizin Berlin rekrutiert. Eingeschlossen wurden Patientinnen mit Kinderwunsch bzw. bestehender Schwangerschaft und mit nach McDonald 2010-Kriterien gesicherter schubförmiger oder progredienter Multipler Sklerose oder Klinisch-isoliertem Syndrom (CIS). Die Studie fokussierte auf die Datenerhebung zu den Auswirkungen einer Schwangerschaft auf die MS-Erkrankung sowie zu den Folgen der MS für eine Schwangerschaft. Der longitudinalen Studienverlauf umfasste eine Baseline-Studienvsiste vor der Schwangerschaft (optional, abhängig davon, ob die Patientinnen zum Zeitpunkt des Studieneinschluss bereits schwanger waren), eine Visite im ersten, zweiten sowie dritten Trimenon und postpartale Visiten innerhalb des ersten Monats sowie drei, sechs, neun und zwölf Monate nach Entbindung.

Entsprechend des Studienziels wurden zu den einzelnen Visitenzeitpunkten klinische Daten zum MS-Krankheitsverlauf wie Schubanzahl und -symptome, Behinderungsgrad nach Expanded Disability Status Scale (EDSS), Therapie und Therapieansprechen erhoben. Des Weiteren erfolgte ein Monitoring der radiologischen Aktivität mittels Magnetresonanztomografie (MRT) zu den Zeitpunkten vor und nach der Schwangerschaft. Zu jeder Visite wurde zudem peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus peripher-venösem Blut der Patientinnen isoliert und kryopreserviert.

Zum Zweck der NK-Zell-Phänotypisierung im Rahmen des hier beschriebenen Promotionsprojekts wurden nur Patientinnen der PreCoMS-Kohorte ausgewählt, die sämtliche Studienvsiten vom ersten Trimenon bis 12 Monate postpartal vollständig durchlaufen haben. Auf diese Weise sollte eine zeitlich möglichst enge Überwachung der immunologischen Mechanismen prä- und postpartal gewährleistet werden. Entsprechend wurden acht Patientinnen ausgewählt. Einen Überblick über die Datenerhebung, Krankheitsaktivität und Therapie während der Studie vermittelt die Abbildung 1. Patientin 3, 4 und 6 wurden bei bereits bestehender Schwangerschaft im ersten Trimester in die Studie eingeschlossen, sodass die PBMC-Probe sowie eine MRT-Aufnahme für den Baseline-Zeitpunkt bei diesen Patientinnen nicht vorlagen.



**Abbildung 1. Überblick zu den Patientinnen.** Die farbigen Balken zeigen den Studienverlauf für die einzelnen Patientinnen und ob postpartal eine Therapie (disease-modifying therapy (DMT), blau, bzw. intravenöse Immunglobulin-Gabe (IVIg), hellgrün) begonnen wurde. Außerdem ist zu jedem Studienzeitpunkt angegeben, welches Material/Daten (Blutentnahme, MRT) gesammelt wurde. Zeitpunkte der Studienvisiten: Baseline-Visite vor Schwangerschaft (pre), Visite während Schwangerschaftswoche  $10 \pm 2$  (erstes Trimenon, Tri1), Schwangerschaftswoche  $22 \pm 2$  (zweites Trimenon, Tri2) und Schwangerschaftswoche  $34 \pm 2$  (drittes Trimenon, Tri3), postpartale (PP) Visiten innerhalb des ersten Monats nach Entbindung (PP0), drei (PP3), sechs (PP6), neun (PP9) und zwölf Monate nach Entbindung (PP12); Informationen zum Verlauf der MS vor der Schwangerschaft: Schubförmig remittierende MS (RRMS), Klinisch-isoliertes Syndrom (CIS), Angaben in Klammern (Krankheitsdauer zu Beginn der Studie in Jahren (t)/ Gesamtanzahl der Schübe vor Studienbeginn (n)). Grafik wurde erstellt mit Microsoft Power Point und Biorender.com.

Die Untersuchungen folgten der aktualisierten Deklaration von Helsinki (2008 und 2013). Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Charité unter der Antragsnummer EA1/173/13 genehmigt. Ein schriftliche Einwilligungserklärung zur Studienteilnahme wurde vor Einschluss von allen Patientinnen basierend auf einer schriftlichen und mündlichen Aufklärung durch den Studienarzt oder die Studienärztin eingeholt. Für die MRT erfolgte zusätzlich eine separate Aufklärung jeweils vor der Untersuchung.

### 3.1.2 Demografische und klinische Merkmale

Informationen zu Demografie und Klinik jeweils nach den einzelnen Patientinnen aufgeschlüsselt finden sich in der nachfolgenden Tabelle 2 - Tabelle 4 und in der Abbildung 2.

**Tabelle 2.** Merkmale der Schwangerschaft

	Alter (Jahre)	Parität <sup>1</sup> (n)	Geschlecht des Kinds	Intervall pre-Tri1 <sup>2</sup> (Monate)	Stillen (Dauer in Monaten)	Vollständiges Stillen (Dauer in Monaten)
Patientin 1	30	0	weiblich	2,3	10	5
Patientin 2	33	0	männlich	9,25	4	3
Patientin 3	39	0	männlich	n.z. <sup>3</sup>	9	4
Patientin 4	33	1	männlich	n.z.	9	5
Patientin 5	26	0	männlich	7	5	3
Patientin 6	33	0	weiblich	n.z.	9	4
Patientin 7	32	1	weiblich	1,8	6	6
Patientin 8	30	0	männlich	9,25	nein	nein

<sup>1</sup> Anzahl der Geburten vor Studienbeginn; <sup>2</sup> Zeitspanne vom Beginn der Studie mit der Baseline-Visite (pre) vor der Schwangerschaft bis zur Visite im ersten Schwangerschaftstrimenon (Tri1); <sup>3</sup> nicht zutreffend (n.z.), da Patientin erst bei bereits bestehender Schwangerschaft zum Tri1-Zeitpunkt eingeschlossen wurde

**Tabelle 3.** Merkmale der Multiplen Sklerose

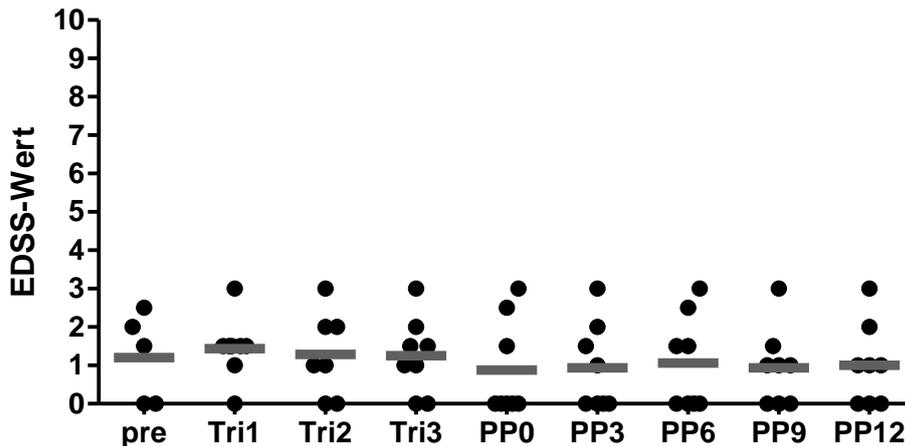
	MS-Verlauf <sup>1</sup>	MS-Dauer <sup>2</sup> Erstsymptom (Jahre)	MS-Dauer <sup>3</sup> Diagnose (Jahre)	Schübe <sup>4</sup> (n)	Schub in letzten 2 Jahren	Letzter Schub <sup>5</sup> (Monate vor Tri1)	Schub Tri1-Tri3	Schub postpartal
Patientin 1	RRMS	1	0,1	1	ja	13	nein	nein
Patientin 2	RRMS	6,5	0,75	2	ja	14	nein	nein
Patientin 3	RRMS	9,5	5,5	2	nein	48	nein	nein
Patientin 4	CIS	2	2	1	ja	24	nein	nein
Patientin 5	RRMS	7,5	7,5	2	ja	29	nein	ja
Patientin 6	RRMS	1	1	1	ja	14	nein	nein
Patientin 7	RRMS	6	0,5	3	ja	19	nein	V.a. <sup>6</sup>
Patientin 8	RRMS	10,75	10,5	3	nein	unklare Angabe	nein	nein

<sup>1</sup> Verlaufsform der Multiplen Sklerose (MS) vor Studienbeginn: schubförmig remittierende MS (RRMS), klinisch-isoliertes Syndrom (CIS); <sup>2</sup> Krankheitsdauer seit Erstsymptomatik bis zum Studieneinschluss; <sup>3</sup> Krankheitsdauer seit Diagnose bis zum Studieneinschluss; <sup>4</sup> Gesamtanzahl der Schübe vor Studieneinschluss; <sup>5</sup> zeitlicher Abstand des letzten Schubs vor Studieneinschluss zur Visite im ersten Trimenon (Tri1) <sup>6</sup> Verdacht auf (V.a.) Schubereignis

**Tabelle 4.** Therapie der Multiplen Sklerose (MS) vor und nach der Schwangerschaft

	DMT <sup>1</sup> vor der Schwangerschaft	DMT-freies Intervall <sup>2</sup> (Monate)	DMT postpartal	Beginn einer DMT postpartal (Monate)	sonstige MS-Therapien
Patientin 1	DMT naive	n.z. <sup>5</sup>	keine	n.z.	nein
Patientin 2	Glatirameracetat	1	Glatirameracetat	4,5	nein
Patientin 3	Glatirameracetat	1,5	Glatirameracetat	11,3	IVIg <sup>3</sup> (erste 11 Monate PP)
Patientin 4	DMT naive	n.z.	keine	n.z.	nein
Patientin 5	Glatirameracetat	1	Fingolimod	5,8	GK-Schubtherapie <sup>4</sup>
Patientin 6	DMT naive	n.z.	keine	n.z.	nein
Patientin 7	Dimethylfumarat	2	Dimethylfumarat	11,8	GK-Schubtherapie <sup>4</sup>
Patientin 8	Interferon $\beta$ -1a	1,3	Fingolimod	1,5	nein

<sup>1</sup> Disease-modifying therapy (DMT); <sup>2</sup> therapiefreies Intervall vor der Visite im ersten Trimester (Tri1); <sup>3</sup> postpartale (PP) Applikation von intravenösen Immunglobulinen (IVIg); <sup>4</sup> Schubtherapie mit Glukokortikoiden (GK); Patientin 5 erhielt GK wenige Tage vor der PP6-Studienvsiste aufgrund eines Schubs. Patientin 7 erhielt GK wenige Tage vor der PP9-Studienvsiste aufgrund des V.a. Schub. 5 nicht zutreffend (n.z.)



**Abbildung 2. Grad der Behinderung nach Expanded Disability Status Scale (EDSS).** Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin und der Median vor, während und nach der Schwangerschaft. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 mittels Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ergab keine signifikante Veränderung. Studienzeitpunkte: vor der Schwangerschaft (pre), während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3, 6, 9 und 12 Monate nach Entbindung (PP3-12).

### 3.1.3 Gewinnung des Zellmaterials

Blutentnahme, Isolierung und Kryopreservation der mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) wurde durch das Personal des Studienlabors im NeuroCure Clinical Research Center, Charité nach den dortigen Protokollen durchgeführt.

Zu jeder Studienvsiste erfolgte die Entnahme von peripher-venösem Vollblut in Heparin-haltige Entnahmeröhrchen. Direkt im Anschluss wurde das Vollblut 1:1 mit Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt, zu je 25ml auf 15ml Biocoll-Trennlösung (Dichte 1,077 g/ml) aufgeschichtet und bei 760g 20 Minuten ohne Dezeleration zentrifugiert. Die PBMCs wurden aus dem dabei entstandenen Dichtegradienten separiert. Mehrere Waschschrinen mit PBS und Waschmedium (enthält Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium mit 20% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure-Puffer (HEPES)) folgten. Die Zellzahl wurde nach Anfärben mit Trypanblau in der Neubauerzählkammer bestimmt. Abschließend wurden jeweils  $7,5 \times 10^6$  Zellen pro Kryoröhrchen in Einfriermedium bestehend aus RPMI-1640 Medium mit 20% FCS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aliquotiert. Der Einfrierprozess schloss sich sofort nach Hinzugabe des DMSO an. Zuerst erfolgte eine kontinuierliche Absenkung der Temperatur im Mr. Frosty auf  $-80^{\circ}\text{C}$ . Anschließend wurden die Zellen dauerhaft im Stickstofftank des NCRC gelagert.

Das Patientenmaterial wurde in flüssigem Stickstoff vom NCRC in das Institut für Medizinische Immunologie, Charité, transportiert, in dem nach Zwischenlagerung im Stickstofftank die durchflusszytometrische Messung der PBMCs erfolgte.

### 3.1.4 Magnetresonanztomografie

Die in dieser Arbeit analysierten Daten zu Anzahl und Volumen der T2-gewichteten MRT-Läsionen wurden durch die Mitarbeiter des NeuroCure Clinical Research Center, Charité, generiert und bereitgestellt. Die anschließende statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Im Rahmen der PreCoMS-Studie wurden MRT-Messung zur Detektion cerebraler Läsionen während der Baseline-Visite vor Schwangerschaft sowie zu allen postpartalen Visiten durchgeführt (Schema der MRT-Datenerhebung bezogen auf die einzelnen Patientinnen siehe Abbildung 1). Eine Aufklärung der Patientinnen erfolgte zum Studieneinschluss sowie unmittelbar vor jeder MRT-Untersuchung. Aufgrund von Klaustrophobie wurden bei Patientin 8 keine MRT durchgeführt.

Die Durchführung und Auswertung der MRT-Messungen erfolgte nach dem Protokoll des NeuroCure Clinical Research Center, Charité. Alle MRT-Daten wurden hiernach im selben 1,5 Tesla MR-Tomografen (MAGNETOM Sonata Siemens, Erlangen, Deutschland) generiert. Es wurde die folgenden Sequenzen verwendet: volumetrische hochauflösende T1-gewichtete Sequenz (MPRAGE, magnetization prepared rapid acquisition gradient echo; Parametereinstellungen: repetition time [TR] = 2,110 ms; echo time [TE] = 4.38 ms; inversion time [TI] = 1100 ms; FOV=256 x 256 mm<sup>2</sup>; slice thickness 1mm); axiale T2-gewichtete Sequenz (TIRM, ‚turbo inversion recovery magnitude‘; Parameter: TR/TE/TI = 10,000/108/2,500 ms; FOV = 256 x 256 mm<sup>2</sup>, slice thickness 3.0 mm). Zur Bestimmung des Gesamt-Läsionsvolumen wurde die Segmentierung der T2-gewichteten TIRM-Aufnahmen (turbo inversion recovery magnitude) aller Patientinnen mittels MATLAB-basierten Lesion Segmentation Toolbox (LST) für Statistical Parametric Mapping (96) von drei geschulten Assistenten halbautomatisch durchgeführt und verifiziert. Die Supervision erfolgte durch einen Neuroradiologen unter Verwendung von ITK-SNAP ([www.itksnap.org](http://www.itksnap.org)) (97).

## 3.2 Material

In der nachfolgenden Tabelle 5 - Tabelle 10 sind die Materialien aufgelistet, die für dieses Promotionsprojekt verwendet wurden.

**Tabelle 5.** Medien/Puffer

<b>Puffer/Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	<b>Hersteller</b>
Auftaumedium	RPMI-1640	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
	10% Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
FACS-Puffer	PBS	
	0,5% Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS), pH 7,2	137 mM NaCl	Gibco®, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
	2,7 mM KCl	
	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
Trypanblau-Lösung	PBS	
	0,4% Trypanblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf, Deutschland

**Tabelle 6.** Weitere Reagenzien

<b>Produktbezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
FcR Blocking Reagent (Fc Block)	Miltenyi Biotec, B. Gladbach, Deutschland
Lebend-Tot-Farbstoff (L/D) Zombie NIR™	Biolegend, San Diego, USA
VersaComp Antibody Capture Bead Kit	Beckman Coulter, Brea, USA

**Tabelle 7.** Antikörper

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Hersteller</b>
CCR7 BV421	G043H7	Biolegend, San Diego, USA
CD127 BV785	A019D5	Biolegend, San Diego, USA
CD14 Alexa700	63D3	Biolegend, San Diego, USA
CD16 BUUV395	3G8	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD19 Alexa700	HIB19	Biolegend, San Diego, USA
CD20 Alexa700	2H7	Biolegend, San Diego, USA
CD27 BV711	M-T271	Biolegend, San Diego, USA
CD27 PE	M-T271	Biolegend, San Diego, USA
CD3 Alexa700	UCHT1	Biolegend, San Diego, USA
CD56 PE/Dazzle594	5.1H11	Biolegend, San Diego, USA
CD94 APC	DX22	Biolegend, San Diego, USA

Antikörper	Klon	Hersteller
CX3CR1 BV605	2A9-1	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
DNAM1 PerCP/Cy5.5	11A8	Biolegend, San Diego, USA
NKG2A PE/CY7	Z199	Beckman Coulter, Brea, USA
NKG2C Alexa488	#134591	R&D Systems, Minneapolis, USA
NKG2D BV510	1D11	Biolegend, San Diego, USA
NKp46 BV650	9E2	Biolegend, San Diego, USA

Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, finden sich die Lang-Bezeichnungen der Fluorochrome im Abkürzungsverzeichnis. Die Antikörper wurden in den in Tabelle 12 angegebenen Verdünnungen verwendet.

**Tabelle 8.** Verbrauchsmaterialien

Materialbezeichnung	Hersteller
Combitips® 5 / 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Röhren 1,5 / 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon™ Röhren (konisch, 15 / 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon™ Röhren (rund, 5 ml, mit Filteraufsatz)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Micronic Röhren 1, 10 ml	Micronic, Lelystad, Niederlande
Parafilm	American Can Company, Greenwich, USA
Pipettenspitzen 10 / 200 / 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5 / 10 / 25 / 50 ml	BD Medical, Heidelberg, Deutschland
Sterican® Kanülen	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Vasco® Nitril Handschuhe	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

**Tabelle 9.** Geräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Durchflusszytometer LSR Fortessa™	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
GFL Wasserbad	GFL, Burgwedel, Deutschland
Heraeus Multifuge 3SR+	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mikroskop Wilovert S Inverted	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland
Multipette®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
Pipetten 2 / 10 / 20 / 200 / 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Sterilbank HeraSafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vacuum Pumpe	KNF Neuberger Inc., Trenton, USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, USA

**Tabelle 10.** Software

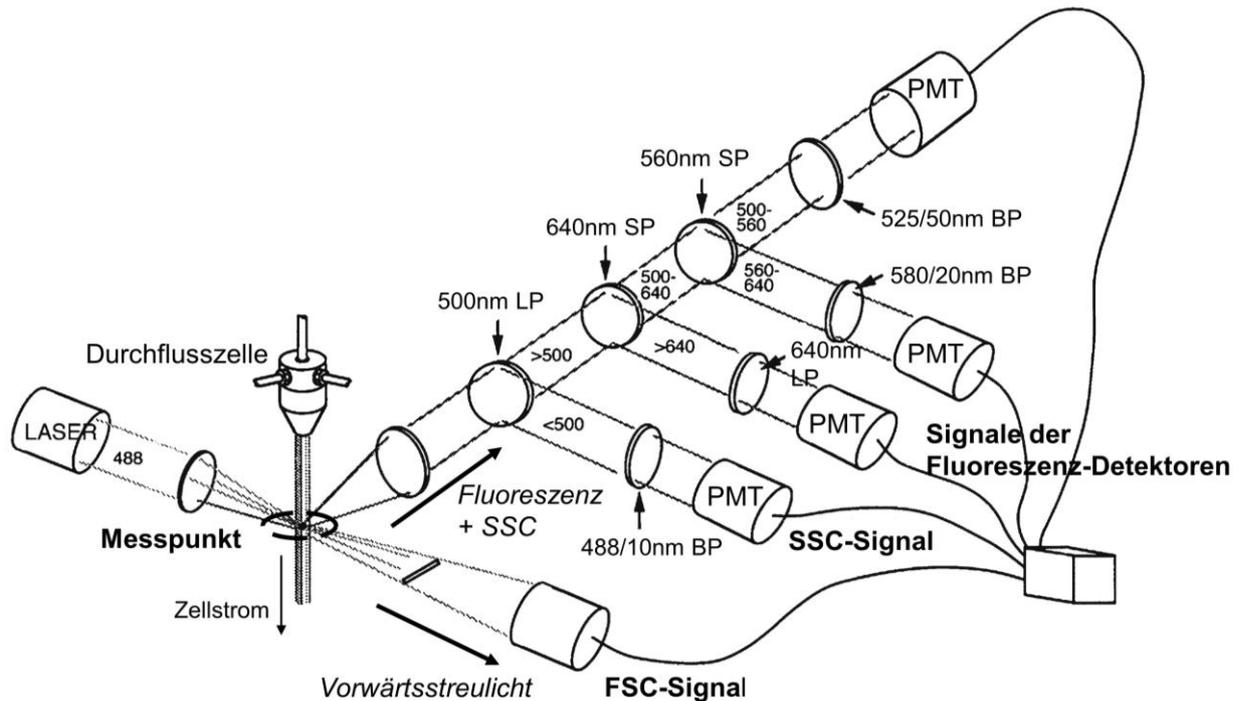
<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
BD FACSDiva™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biorender	Science Suite Inc., Toronto, Kanada
Cytobank	Cytobank Inc., Santa Clara, USA
Endnote X7.8	Thomson Reuters, USA
FlowJo v10.4	FlowJo LLC, Ashland, USA
GraphPad Prism v8	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
Microsoft Office 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
SPSS Statistics 26	IBM, Armonk, USA

### 3.3 Durchflusszytometrie

#### 3.3.1 Grundlagen der Durchflusszytometrie

Die Funktionsweise der Durchflusszytometrie ist dadurch charakterisiert, dass einzelne Zellen in einem Flusssystem an einer Lichtquelle vorbeigeführt und die resultierenden optische Signale für jede Zelle individuell detektiert und analysiert werden. Auf diese Weise kann innerhalb kürzester Zeit die multiparametrische Vermessung einer hohen Anzahl von Einzelzellen (500 bis zu über 5000/s) erfolgen. In der Immunologie können somit Zellen hinsichtlich physikalischer Eigenschaften (Zellgröße, Granularität) und molekularer Merkmale (Nachweis einzelner Proteine auf der Zelloberfläche oder intrazellulär nach Färbung mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern) charakterisiert werden. Die Messprinzipien der Durchflusszytometrie wurde in Abbildung 3 zusammengefasst. Details finden sich in der Publikation von Givan et al. (98) sowie in den ‚Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies‘ (99).

In dieser Promotionsarbeit wurde das Durchflusszytometer LSR Fortessa™ von BD Pharmingen genutzt, welches über fünf verschiedene Laser und 18 Detektionskanäle (PMTs) für Fluoreszenzsignale verfügt. Angaben zu den Fluorochromen des Multicolor-Antikörper-Panels sowie zu dessen Etablierung finden sich in den folgenden Abschnitten.



**Abbildung 3. Messprinzipien der Durchflusszytometrie.** In der Durchflusszelle findet die hydrodynamische Fokussierung des Zellstroms statt. Am Messpunkt trifft der Laserstrahl auf die vorüber fließenden Einzelzellen. Dies führt zur Streuung des Lichts (FSC/SSC) sowie zur Emission von Fluoreszenzlicht (bei Färbung mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern), welches durch ein System von Spiegeln und Filtern nach Wellenlänge aufgetrennt wird. Die einzelnen Photomultiplier Tubes (PMT) detektieren das zugeführte Licht, welches abhängig von den vorgeschalteten Filtern in einem spezifischen Wellenlängenbereich liegt. Diesen wellenlängen-spezifischen Detektionskanäle („detection channels“) kann jeweils ein bestimmtes Fluorochrom (entsprechend des Emissionsspektrums) zugeordnet werden. Das Lichtsignal wird durch den Photodetektor (PMT) in ein elektrisches Signal umgewandelt und verstärkt. Abschließend werden die Informationen zu Höhe, Länge und Fläche des Signalpulses extrahiert. LP, Long Pass-; SP, Short Pass-; BP, Band Pass-Filter. Abbildung modifiziert nach (98).

### 3.3.2 Oberflächenfärbung mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern

In der vorliegenden Studie wurden NK-Zellen hinsichtlich der Expression von relevanten Molekülen auf der Zelloberfläche phänotypisiert. Nach Vorbereitung der kryopreservierten PBMCs wurde hierzu eine Oberflächenfärbung mit einem 14-farbigem Antikörper-Panel durchgeführt (genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 12).

In Vorbereitung auf die Antikörperfärbung wurden die bei  $-168^{\circ}\text{C}$  kryopreservierten PBMCs im Kryoröhrchen in ein  $37^{\circ}\text{C}$  warmes Wasserbad überführt und hier für 9 Minuten aufgetaut. Um DMSO aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde diese vorsichtig in 9ml Auftaumedium (auf  $37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt) verdünnt und zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte im Rahmen der Vorbereitung und Färbung der Zellen wurden für 7 min bei  $400 \times g$  und Raumtemperatur durchgeführt. Nach Resuspension erfolgte die Zellzahlbestimmung (inkl. Bestimmung des Anteils toter Zellen) unter Verwendung von Trypanblau, einem Farbstoff zum Nachweis sterbender bzw.

toter Zellen, in der Neubauerzählkammer. Für die Antikörperfärbung wurden  $1,2 \times 10^6$  Zellen in ein 1,1 ml Micronic-Röhrchen überführt, mit 1ml PBS gewaschen und zentrifugiert.

Die Oberflächenfärbung mit fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurde im Dunklen bei Raumtemperatur durchgeführt und umfasste drei Arbeitsschritte:

1. Inkubation mit anti-human Fc-Block in 50  $\mu$ l (1:50 in PBS) für 5 min. zur Reduktion von Antikörperbindungen an die Fc-Rezeptoren der Zellen, anschließendes Waschen mit 1 ml PBS und Zentrifugation;
2. Färbung mit 50  $\mu$ l Antikörperlösung aus anti-CCR7 und Farbstoff zur Lebend-Tot-Diskrimination (L/D) in PBS für 15 min.;
3. Direkte Hinzugabe der zweiten Antikörperlösung (50  $\mu$ l) bestehend aus allen restlichen Antikörpern des NK-Zell-Panels in FACS-Puffer und Inkubation für weitere 15 min. (totales Färbevolumen in diesem Schritt: 100  $\mu$ l).

Die Antikörperlösungen sowie die Fc-Block-Lösung wurden im Vorhinein angesetzt, um eine schnelle Hinzugabe sowie eine konstante Inkubationszeit zu gewährleisten.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und in 200  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde unter Verwendung eines Filters mit 30  $\mu$ m Poren gefiltert und für die unmittelbar folgende durchflusszytometrische Messung in FACS-Röhrchen transferiert.

### **3.3.3 Etablierung des Multicolor-Antikörper-Panels**

Die sorgfältige Etablierung des multiparametrischen Antikörper-Panels bildet das Fundament für aussagekräftige, qualitativ hochwertige Daten. Hierbei müssen Fehlerquellen und technische Limitationen der Durchflusszytometrie korrigiert sowie das Verhältnis von Signal zu Rauschen (signal-to-noise ratio, SNR) optimiert werden. Der Prozess der Etablierung des in dieser Studie verwendeten NK-Zell-Panels umfasste die folgenden Schritte:

1. Auswahl von NK-Zell-Markern nach dem neusten Stand der Fachliteratur
2. Paneldesign – Zuordnung der biologischen Marker zu adäquaten Fluorochromen und Detektionskanälen
3. Titration der Antikörperkonzentrationen
4. Identifikation optimaler PMT-Einstellungen
5. Kontrolle des spektralen Spillovers (Kompensation) und des Backgrounds (FMO)
6. Tests und Optimierung des Panels

Die einzelnen Etablierungsversuche wurden nach dem oben beschriebenen Färbeprotokoll durchgeführt. Das Zellmaterial (kryopreservierte PBMCs) stammte von gesunden Kontrollpersonen.

#### *Auswahl der NK-Zell-Marker*

Um den NK-Zell-Phänotyp detailliert zu beschreiben, wurden auf Basis einer strukturierten Literaturrecherche 12 relevante NK-Zell-Oberflächenmoleküle identifiziert. Der Fokus der Literaturrecherche lag auf dem aktuellen Kenntnisstand zur allgemeinen NK-Zell-Biologie (Phänotypen und Funktionsweise) sowie zur Bedeutung der NK-Zellen in Schwangerschaft und Autoimmunität (im Speziellen bei MS) und der Identifikation hiermit assoziierter NK-Zell-Biomarker. Als Grundgerüst der NK-Zell-Analyse wurden die Moleküle CD56 und CD16 ausgewählt, mittels derer sich die klassischen NK-Zell-Subpopulationen definieren lassen (siehe (8)). Für die tiefergehende Studie des NK-Zell-Phänotyps wurden Marker eingeschlossen, anhand derer sich das Potential der NK-Zellen zur Aktivierung (aktivierende und inhibierende NK-Zell-Rezeptoren), die Migrationskapazität sowie der Maturationsstatus beurteilen lassen (siehe Tabelle 11).

Zusätzlich wurden die CD-Antigene CD3, CD19, CD20 und CD14 als Lineage-Marker bestimmt, um T- und B-Zellen sowie Monozyten innerhalb der PBMC-Probe zu identifizieren, diese von der Analyse auszuschließen und entsprechend selektiv die NK-Zell-Population zu analysieren.

Um zudem einen Überblick von der schwangerschaftsbezogenen Entwicklung der Frequenz der ILCs (innate lymphoid cells) zu erhalten, wurde der pan-ILC-Marker CD127 miteinbezogen. CD127 wurde zusätzlich in der Analyse des NK-Zell-Phänotyps verwendet.

**Tabelle 11.** Marker der NK-Zell-Phänotypisierung

Marker	Biologische Funktion	CD56 <sup>bright</sup>	CD56 <sup>dim</sup>	Bedeutung bei MS
<b>Marker zur Definition der NK-Zell-Populationen</b>				
CD56	neurales Zelladhäsionsmolekül-1 (NCAM1) vermittelt homophile Zellbindungen, Bedeutung für die NK-Zell-Maturation (100)	++	+	Protektive Rolle der CD56 <sup>bright</sup> in Pathogenese und Therapie der MS vermutet (22, 39)
CD16	Low-affinity Fcγ-Rezeptor-IIIa bindet die Fc-Region von an Zielzellen gebundenen Immunglobulinen und vermittelt die antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) (9)	±	++	Reduktion der CD16 <sup>+</sup> Perforin <sup>+</sup> NK-Zellen bei MS-Patienten und MS-Patientinnen (39)
<b>Aktivierende NK-Zell-Rezeptoren</b>				
CD94/NKG2C	C-Typ-Lektin-ähnliches Rezeptorheterodimer, bindet MHC-Ib-Molekül HLA-E (Maß der Gesamt-MHC-Ia-Expression einer Zelle), aktivierende Wirkung über zytoplasmatische ITAM-Sequenz <sup>1</sup> vermittelt (15)  Marker des adaptiven NK-Zell-Phänotyps CD56 <sup>dim</sup> CD94/NKG2C <sup>+</sup> bei HCMV <sup>+</sup> Individuen <sup>2</sup> (101)	±	±	Expansion NKG2C <sup>+</sup> NK-Zellen bei HCMV <sup>+</sup> Status assoziiert mit geringerer MS-Progression (102)
NKp46	Natürlicher Cytotoxizitätsrezeptor (NCR), induziert über NK-Zell-Degranulation (Perforin, Granzym) die Zytolyse der Zielzelle, als Ligand wird HA HN <sup>3</sup> vermutet (9)  Selektiv auf NK-Zellen exprimiert, pan-NK-Zell-Marker (100)  Relevanz für NK-Zell-vermittelte Suppression von T-Zellen <sup>4</sup>	++	+	NKp46-Expression nicht verändert bei MS im Vergleich zu gesunden Kontrollen (59, 103)  Gesteigerte NKp46-Expression bei Therapie mit Glatirameracetat korreliert mit gesteigerter NK-Zytotoxizität (104)
NKG2D	C-Typ-Lektin-ähnliches Rezeptorhomodimer, bindet Zellstress-induzierte Selbst-Moleküle (MIC-A/B, ULBP), induziert NK-Zell-Aktivierung und Degranulation/Zytolyse (9, 105)	++	±	NKG2D-Expression nicht verändert bei MS im Vergleich zu gesunden Kontrollen (60),

Marker	Biologische Funktion	CD56 <sup>bright</sup>	CD56 <sup>dim</sup>	Bedeutung bei MS
	Relevanz für NK-Zell-vermittelte Suppression von T-Zellen <sup>4</sup>			NKG2D-abhängige Suppression von Th17 durch NK-Zellen nach aHSCT <sup>5</sup> bei MS (106)
DNAM	DNAX accessory molecule-1 (DNAM) bindet die Liganden CD155 (Poliovirusrezeptor, PVR) und CD112 (Nectin-2), unterstützt Induktion der NK-Zell-Zytotoxizität (15, 107)  Relevanz für NK-Zell-vermittelte Suppression von T-Zellen <sup>4</sup>	+	++	Polymorphismen im DNAM-1-Gen mit erhöhtem MS-Risiko assoziiert (108)  Reduzierte NK-Zytotoxizität gegenüber aktivierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen assoziiert mit beeinträchtigter DNAM-CD155-Interaktion, Wiederherstellung durch Daclizumab (60)
<b>Inhibierende Rezeptoren</b>				
CD94/NKG2A	C-Typ-Lektin-ähnliches Rezeptorheterodimer, bindet MHC-Ib-Molekül HLA-E (Maß der Gesamt-MHC-Ia -Expression einer Zelle), inhibitorische Wirkung über zytoplasmatische ITIM-Sequenz <sup>1</sup> vermittelt (15)  Relevanz für NK-Zell-vermittelte Suppression von T-Zellen <sup>4</sup>	++	±	Verstärkte Inhibition der CD56 <sup>bright</sup> über NKG2A-HLA-E-Interaktion bei MS (59)
<b>Maturations- und Migrationsmarker</b>				
CD27	TNF-Rezeptor-Familie, Maturationsmarker wird auf Phase 4 NK-Zellen (CD56 <sup>bright</sup> ) exprimiert und bei der Entwicklung zu Phase 5 NK-Zellen (CD56 <sup>dim</sup> ) herunterreguliert, CD27 <sup>-</sup> NK-Zellen zeigen hohe zytolytische Aktivität (109)	+	±	NK-Zellen des Liquors zeigen immatures CD56 <sup>bright</sup> CD27 <sup>+</sup> CX3CR1 <sup>-</sup> Phänotyp bei MS (64)
CX3CR1	Interaktion zwischen CX3CR1/CX3CR1-L (Fractalkine) vermittelt die Migration von NK-Zellen ins ZNS im Tiermodell (42)	-	++	Erhöhte Frequenz unreifer CX3CR1 <sup>-</sup> NK-Zellen im PB von MS-Patienten und MS-Patientinnen korrelieren mit klinisch stabilen Phasen (57)

Marker	Biologische Funktion	CD56 <sup>bright</sup>	CD56 <sup>dim</sup>	Bedeutung bei MS
	Maturationsmarker, der auf terminal differenzierten, reifen CD56 <sup>dim</sup> exprimiert wird, CX3CR1 <sup>+</sup> NK-Zellen zeigen erhöhte zytotoxische Aktivität (57, 110)			EAE-Exazerbation in CX3CR1 <sup>-/-</sup> defizienten Mäusen assoziiert mit verminderter Rekrutierung reifer NK-Zellen ins ZNS (43)
CCR7	Chemokin-Rezeptor, bindet die Liganden CCL19 und CCL21, vermittelt NK-Zellen-Migration in die sekundär lymphatisches Gewebe (SLT) als Ort des Crosstalks von NK-Zellen mit DCs und T-Zellen (111)	++	-	Therapie mit Fingolimod führt zur Reduktion von CD56 <sup>bright</sup> CD62L <sup>+</sup> CCR7 <sup>+</sup> NK-Zellen im PB (Blockade des Egress aus den Lymphknoten) (112)
<b>Weitere Marker</b>				
CD127	α-Kette des IL-7-Rezeptors (IL-7Rα), Bedeutung für die NK-Zell-Homöostase und NK-Zell-Survival (113)	+	-	Polymorphismus in IL-7Rα-Gene mit erhöhtem MS-Risiko assoziiert (114)  Erhöhung der IL-7Rα-Expression auf CD56 <sup>bright</sup> NK-Zellen bei MS-Patienten und MS-Patientinnen (115)

Expression des Markers auf NK-Zell-Populationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> (Angaben aus (55, 100)): ++, hohe Expression; +, schwache Expression; ± Expression nur auf einer Subpopulation; -, keine Expression; <sup>1</sup> Aminosäuresequenzen der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors: ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) oder ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif); <sup>2</sup> Infektion mit dem humane Cytomegalievirus (HCMV) verursacht die Generation adaptiver NK-Zellen; <sup>3</sup> Hämagglutinin des Influenzavirus (HA HN) ; <sup>4</sup> siehe Tabelle 1; <sup>5</sup> autologe hämatopoetische Stammzelltransplantation (aHSCT)

### *Design des Multicolor-Antikörper-Panels*

Die Aussagekraft der multiparametrischen Durchflusszytometrie steht und fällt mit der Erstellung qualitativ hochwertiger Multicolor-Panel. Im Fokus steht die möglichst optimale Auflösung zwischen negativer, dim- und bright-positiver Zellpopulation für jeden einzelnen Marker. In diesem Zusammenhang ist das Phänomen ‚Spreading Error‘ (SE) von erheblicher Tragweite und ein sorgfältiges Paneldesign muss in erster Linie die Folgen dieses Messfehlers berücksichtigen und minimieren. Die alleinige Reduktion des spektralen Overlaps ist hingegen nachrangig für die Qualität von Multicolor-Panels, da dieser durch Kompensation adäquat korrigiert werden kann (99).

Vor diesem Hintergrund wurden die ausgewählten NK-Zell-Marker den passenden Fluorochromen und Detektionskanälen des Durchflusszytometer LSR Fortessa™ zugeordnet. Das komplexe Design des Multicolor-Panels erfolgte in Kollaboration mit der Firma Biolegend und dem Dipl.-Biol. Mathias Streitz (Leiter der Core Facility Flow Cytometry des IMI) (siehe Kapitel 3.6).

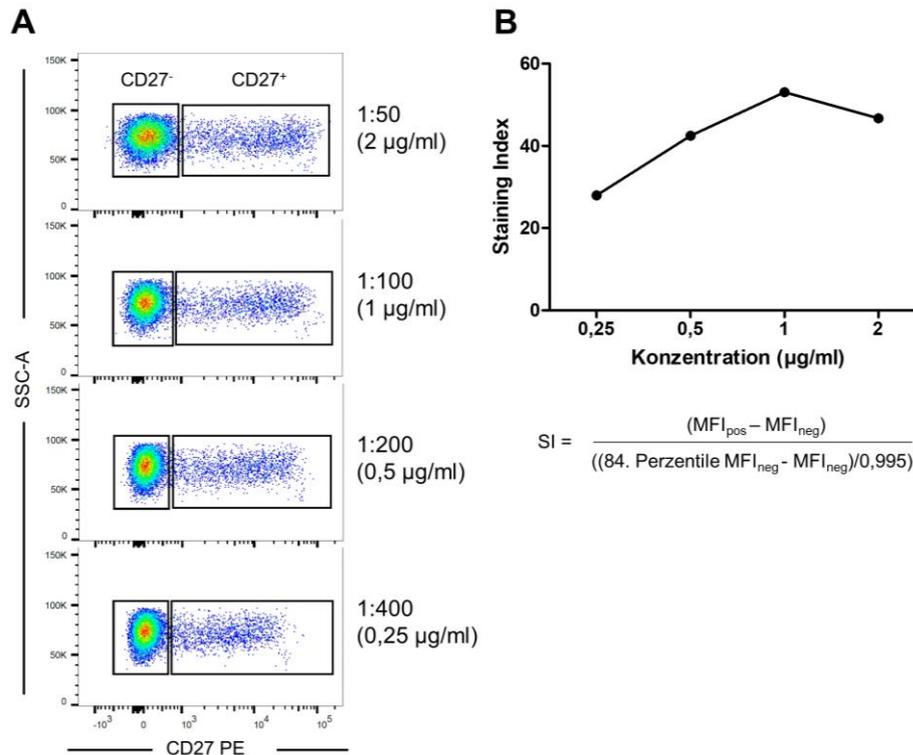
### *Titration der Antikörper*

In Hinblick auf die Sensitivität der Merkmalsdetektion macht die Identifikation der optimalen Antikörper-Konzentration (Titration) einen essentiellen Schritt der Panel-Etablierung aus. Innerhalb einer Titrationsreihe gilt diejenige Konzentration als optimal, bei der der Saturationspunkt der Antikörperfärbung erreicht ist, d.h. eine weitere Steigerung der Konzentration nicht zu einer weiteren Verbesserung des Signals führt. (99).

Im Rahmen des Promotionsprojekts wurden sämtliche Antikörper für die Zielpopulation NK-Zellen und nach den experimentellen Bedingungen der Oberflächenfärbung (siehe Protokoll in Kapitel 3.3.2) titriert. Hierfür wurden kryopreservierte PBMCs verwendet. Mittels einer 1:2 Dilutionsreihe wurde jeder Antikörper in vier Schritten ausgehend von der Konzentration der Hersteller-Angaben verdünnt. Da die erforderliche Antikörper-Konzentration zum Teil erheblich in Abhängigkeit von der Lymphozyten-Linie variiert (z.B. erhöhte Konzentration von anti-CD27 zum Nachweis von CD27 auf NK-Zellen im Vergleich zu T-Zellen notwendig), wurde die Titration spezifisch für die NK-Zell-Population beurteilt, welche durch Gating der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten identifiziert wurden.

Die Beurteilung der Titration erfolgte a) nach der Auftrennung zwischen positiver und negativer Population im Dot-Plot und b) nach dem sog. Staining Index (SI, Berechnung nach (116)) als Maß für die SNR (Vorgehen exemplarisch für anti-CD27 in Abbildung 4). Als optimal wurde i.d.R. die Konzentration mit der besten Positiv-Negativ-Separation sowie dem höchsten SI ausgewählt. In Einzelfällen (z.B. bei sehr hellen Fluorochromen) wurde sub-saturierende Konzentrationen (99)

gewählt – vorausgesetzt die Auftrennung im Dot Plot wurde dadurch nicht beeinträchtigt (siehe Abbildung 4).



**Abbildung 4. Titration des anti-CD27 Antikörpers (Klon M-T271) konjugiert mit PE.** Dargestellt ist die CD27-Expression der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten, d.h. v.a. die NK-Zellen als Zielpopulation der Studie. **(A)** Pseudocolor Density Plots der einzelnen Verdünnungsstufen 1:50 - 1:400. Die Analysefenster für die CD27<sup>-</sup> und CD27<sup>+</sup> Population wurden für jede Stufe angepasst. Es wurde die 1:200 Verdünnung (0,5 µg/ml) ausgewählt, da hier eine hinreichend gute Auftrennung zwischen negativer und positiver Population erreicht wurde. **(B)** Staining Index als Maß für die Sensitivität der Detektion des Signals (positive Population) gegenüber dem Background (negative Population), kalkuliert nach der abgebildeten Formel nach Telford et al. (116). Der Saturationspunkt der Titration war bei einem Titer von 1 µg/ml erreicht. Da bei einer Konzentration von 0,5 µg/ml immer noch eine gute Auftrennung von CD27<sup>-</sup> und CD27<sup>+</sup> gewährleistet war (siehe A), wurde diese im Sinne einer sub-saturierenden Konzentration für die Verwendung gewählt. MFI<sub>pos/neg</sub>, Median der Fluoreszenzintensität der positiven bzw. negativen Population.

#### *Einstellung der PMT-Voltages*

Die Spannung der PMTs bestimmt direkt den Grad der Amplifikation des Lichtsignals und beeinflusst so die Auflösung zwischen Signal und Background (99).

Die optimale Spannung wurde zu Beginn einer jeden Titrationsmessungen für die verwendeten PMTs einzeln ermittelt. Hierbei wurde das in den Cytometer Setup and Tracking (CS&T)-Einstellungen angegebene Spannungs-Minimum und -Maximum des jeweiligen PMTs beachtet, um eine Signaldetektion im linearen Bereich zu gewährleisten. Die Spannung wurde nach folgenden Aspekten adjustiert: Zuerst wurde die Lage und Breite der negativen Population (Background) in Bezug auf die Log-Skala bei CS&T Spannungs-Minimum beurteilt. Anschließend

wurde die Auftrennung zwischen positiver und negativer Population optimiert. Durch schrittweise Erhöhung der Spannung wurde jener Wert als optimal ausgewählt, welcher eine gute Auflösung bei gleichzeitig möglichst geringem Spread der negativen Population zeigte.

### *Kompensation*

Der Fluoreszenz-Spillover stellt ein Grundproblem der Multicolor-Durchflusszytometrie dar. Spillover beschreibt das Signal eines Fluorochroms in einem sekundären, für ein anderes Fluorochrom spezifischen Detektionskanal (siehe Überblick in (99)). Ursächlich hierfür ist, dass Fluorochrome in der Regel relativ breite Emissionsspektren aufweisen und somit über den primär zugeordneten Detektionskanal hinaus auch in weiteren Kanälen detektiert werden. Hieraus resultiert in den vom Spillover betroffenen Channels ein falsch-positives Signal.

Die Korrektur des Spillovers erfolgt mittels software-gestützter Kompensation unter Verwendung sog. Spillover-Werten (spillover values, SOV), die in Einzelfärbung (Kompensationskontrollen) mit dem jeweiligen Fluorochrom ermittelt werden. Die Genauigkeit der SOVs und damit die fehlerfreie Kompensation sind erheblich von der Qualität der Kompensationskontrollen abhängig. Daher wurden die folgenden Gütekriterien für Kompensationskontrollen angewendet (99):

1. Die Fluorochrome der Kompensationskontrollen waren identisch zu denen, die bei der Messung des Studienmaterials verwendet wurden.
2. Es wurde sichergestellt, dass die fluorochrom-negative Population die gleiche Autofluoreszenz wie die positive Population aufweist. Hierzu wurden innerhalb der gleichen Kompensationskontrolle entweder Zellen oder Beads gefärbt. Kryopreservierte PBMCs wurden bevorzugt verwendet. Für einzelne Konjugate konnte hierdurch jedoch keine ausreichende Helligkeit der Färbung erreicht werden. In diesem Fall kamen Antikörper-Capture Beads (VersaComp, Beckman Coulter) zur Anwendung.
3. Es wurde eine möglichst hohe Helligkeit der positiven Population (mindestens so hell wie die Vollfärbung) erreicht.
4. Es wurden ausreichend Events (i.d.R. 20.000) je Kontrolle aufgezeichnet.

Die Kompensation wurde mittels der Software BD FACSDiva™ (während der Messung) und FlowJo v10.4 (finale Kompensationsmatrix) kalkuliert. Anschließend wurde die Auto-Kompensationsmatrix auf Über- bzw. Unterkompensation überprüft und im Einzelfall unter Kontrolle der mittleren Fluoreszenzintensität der Positiv- und Negativ-Population in dem vom Spillover betroffenen Channel korrigiert.

### *Fluorescence Minus One-Kontrollen (FMO)*

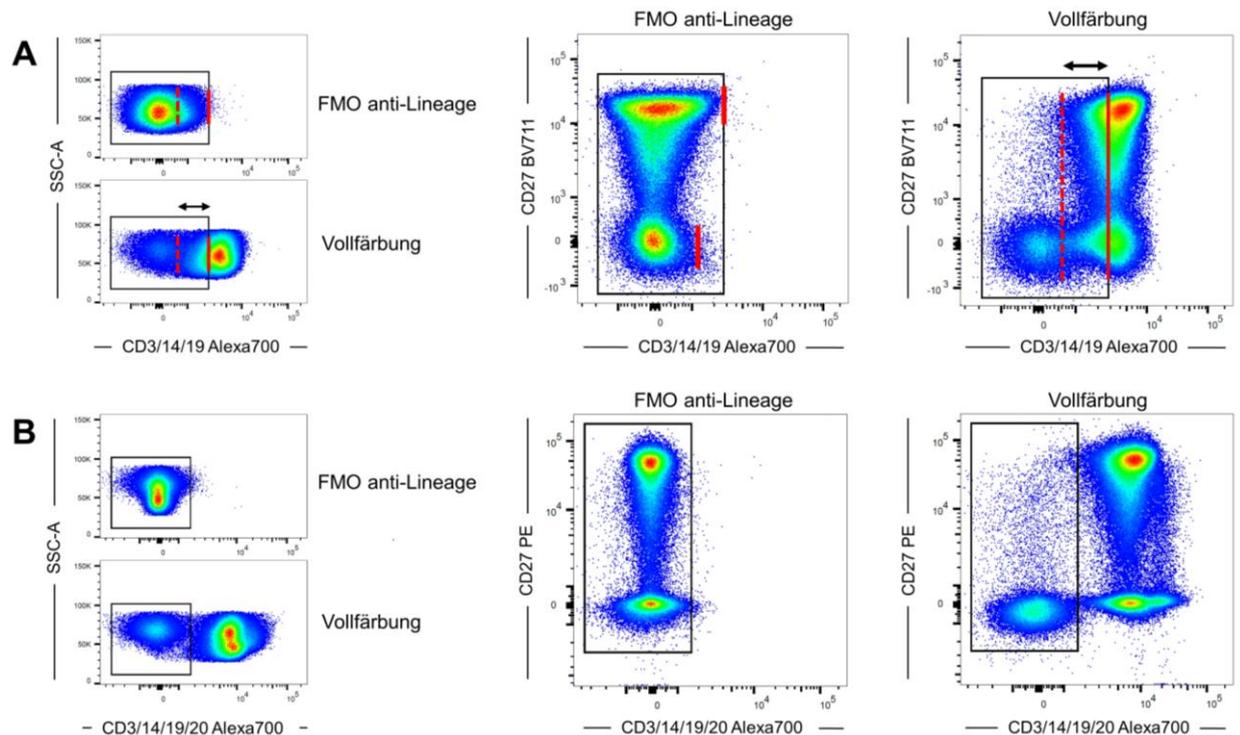
Im Kontext der Multicolor-Durchflusszytometrie dienen FMO-Kontrollen der Bestimmung des Background-Signals in einem gegebenen Detektionskanal. Hierzu enthält diese alle Antikörper des Experiments bis auf den zu kontrollierenden Antikörper. Auf diese Weise kann der Background, aufgrund von Autofluoreszenz und Spread, durch anderen Fluorochromen im jeweiligen Channel beurteilt und der Schwellenwert zwischen negativem und positivem Signal ermittelt werden. Im Resultat können mittels FMO-Kontrollen die Analysefenster zur Definition von Negativ-/Positiv-Population (sog. Gating) akkurat gesetzt werden, was insbesondere für Channels, die einen hohen SE aufweisen oder Dim-Marker detektieren, relevant ist.

### *Tests und Optimierung des Panels*

Nach Abschluss der Zusammenstellung des Panels, der Antikörpertitration sowie der PMT-Einstellungen wurde das gesamte NK-Zell-Panel an kryopreservierten PBMCs getestet. Hierzu wurden neben der Test-Vollfärbung, in der alle Antikörper gleichzeitig gefärbt wurden, Kompensationskontrollen und FMO-Kontrollen für jeden Antikörper eingemessen.

In der Evaluation zeigte sich ein Fehler in der Detektion der Lineage-Merkmale CD3, CD19 und CD20 identifiziert (allesamt durch verschiedene Alexa Fluoro700-konjugierte Antikörper gefärbt), beschrieben in Abbildung 5A. Der Spreading Error im Alexa700-Kanal machte eine sichere Positiv/Negativ-Diskriminierung unmöglich. Entweder würde, bei Verwendung des FMO-Cut-offs (durchgezogene Linie) für das Lin<sup>-</sup> Gate, eine Kontamination der subsequenten Analyse mit Lin<sup>+</sup> Zellen resultieren. Oder die konservative Definition des Cut-offs (gestrichelte Linie) würde ein Verlust wichtiger Lin<sup>-</sup> Zellen nach sich ziehen (aufgrund des Spreads v.a. CD27<sup>+</sup> Zellen, die i.d.R. CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen darstellen). Beide Szenarien waren hinsichtlich der überaus kritischen Rolle der Lineage-Detektion für die Validität der Daten nicht hinnehmbar. Eine Modifikation des ursprünglichen Panel-Entwurfs wurde daher notwendig.

CD27 wurde einem neuen Fluorochrom/Detektionskanal zugeordnet. Nach erneuter Titration wurde anti-CD27 von nun an in Konjugation mit PE verwendet. Zusätzlich wurde die Helligkeit der Lineage-Färbung erneut titriert und optimiert. Da die Färbung mit anti-CD19 trotz optimalem Titer keine besonders hohe Helligkeit der positiven Population aufwies, wurde eine weiterer Alexa700-konjugierter Antikörper mit CD20-Spezifität zur Optimierung der B-Zell-Färbung hinzugefügt. Im Resultat konnte eine gute Auftrennung zwischen Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen erreicht werden (siehe Abbildung 5B).



**Abbildung 5. Spreading Error im Alexa700 Channel.** (A) Beeinträchtigte Auflösung zwischen Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen vor der Anpassung des Panels. Im mittleren Plot (obere Reihe) zeigt sich die Ursache: Das Fluorochrom BV711 verursacht einen deutlichen Spread in den Alexa700-Kanal, in welchem die Lineage-Marker detektiert werden. Die roten Linien verdeutlichen die voneinander abweichenden Schwellenwerte der Alexa700-Positivität in Abhängigkeit von der BV711-Fluoreszenz. Im rechten und linken Plot (obere Reihe) zeigen sich die Folgen des Spreads. Dieser führt zu einer Verbreiterung der Alexa700<sup>-</sup> (Lin<sup>-</sup>) Population (siehe FMO-Kontrolle für Lineage-Färbung). Die roten Linien zeigen die Schwellenwerte der Alexa700-Positivität nach FMO (durchgezogene Linien) und nach rein optischen, konservativ angesetzten Gating-Kriterien (gestrichelte Linien). Bei gleichzeitig geringer Helligkeit des Alexa700-positiven Signals resultiert eine Überlagerung der negativen und positiven Population im Bereich zwischen der gestrichelten und der durchgezogenen Linie (Doppelpfeil). (B) Gute Auflösung zwischen Lin<sup>-</sup> und Lin<sup>+</sup> Zellen nach Anpassung des Panels. Die Verbesserung wurde durch den Wechsel des Antikörperkonjugats für CD27 (neues Fluorochrom PE), Hinzunahme von anti-CD20 und eine erhöhte CD3-Konzentration erreicht.

### 3.3.4 Übersicht zum durchflusszytometrischen Panel der NK-Zell-Studie

Als Resultat der Etablierung zeigt die Tabelle 12 die finale Version des Antikörper-Panels zur NK-Zell-Phänotypisierung. Insgesamt kamen 14 verschiedene Fluorochrome gleichzeitig zur Anwendung. Die Antikörper wurden in der angegebenen Konzentration verwendet.

**Tabelle 12.** Multicolor-Panel zur NK-Zell-Phänotypisierung

	Detektionskanal		Fluorochrom-konjugierter Antikörper			
	LP-Filter	BP-Filter	Spezifität	Fluorochrom	Verdünnung <sup>1</sup>	Konzentration (µg/ml)
<i>UV 355nm</i>	leer	386/23	<b>CD16</b>	BUV395	1:100	2
	705	780/60	<b>CD127</b>	BV785	1:25	2
<i>Violett 404nm</i>	635	660/20	<b>NKp46</b>	BV650	1:100	0,6
	600	610/20	<b>CX3CR1</b>	BV605	1:50	4
	505	525/50	<b>NKG2D</b>	BV510	1:20	6
	leer	450/50	<b>CCR7</b>	BV421	1:25	5,6
<i>Blau 488nm</i>	685	695/40	<b>DNAM1</b>	PerCP-Cy5.5	1:50	4
	505	525/50	<b>NKG2C</b>	Alexa488	1:100	0,2
<i>Gelb-Grün 561nm</i>	750	780/60	<b>NKG2A</b>	PE-Cy7	1:100	0,25
	600	610/20	<b>CD56</b>	PE-Dazzle594	1:200	0,5
	leer	585/15	<b>CD27</b>	PE	1:200	0,5
<i>Rot 639nm</i>	750	780/60	<b>L/D</b>	Zombie NIR	1:1000	
	685	710/50	<b>CD3</b>	Alexa700	1:100	5
			<b>CD19</b>		1:100	5
			<b>CD14</b>		1:400	0,5
			<b>CD20</b>		1:1600	0,3
leer	670/14	<b>CD94</b>	APC	1:50	0,5	

Laser-/Filter-Konfiguration des LSR Fortessa™; <sup>1</sup> Verdünnung bezogen auf ein Gesamtvolumen von 100µl. Abkürzungen: LP, Long Pass Filter; BP, Band Pass Filter. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, finden sich die Lang-Bezeichnungen der Fluorochrome im Abkürzungsverzeichnis.

### 3.3.5 Durchflusszytometrische Messung

Die Messung im Durchflusszytometer (LSR Fortessa™) erfolgte direkt im Anschluss an die Oberflächenfärbung der kryopreservierten PBMCs.

Da durchflusszytometrische Daten zwischen verschiedenen Messtagen deutlich variieren können (sog. Batch-Effekte), wurden je Messtag alle Proben des longitudinalen Studienverlaufs von jeweils zwei Patientinnen gemessen. Zusätzlich wurden messtagspezifische FMO-Kontrollen für alle Marker aufgenommen. Die Kompensation wurde am ersten Messtag der Studie erstellt und auf alle zeitlich nah beieinander liegenden Messtage angewendet.

Vor Beginn jeder Messung wurde die Performance des Zytometers mittels standardisierter Beads (Rainbow Beads) kontrolliert. Es wurden die durch die Etablierung ermittelten PMT-Voltages verwendet. Während des Messvorgangs wurde die Datenaufzeichnung mittels der Software BD FACSDiva™ visualisiert und gesteuert. Für jedes Event wurden hinsichtlich der Fluoreszenz die Fläche (A, area) und Höhe (H) des Signalpulses aufgezeichnet. Es wurde jeweils das gesamte Probenvolumen je Studienzeitpunkt aufgenommen.

Zum Zweck der Erhöhung der n-Zahl wurden die Proben von zwei Patientinnen nachträglich eingemessen. Hierfür wurden die PMT-Voltages sowie die Kompensation entsprechend angepasst.

## 3.4 Analyse der durchflusszytometrischen Daten

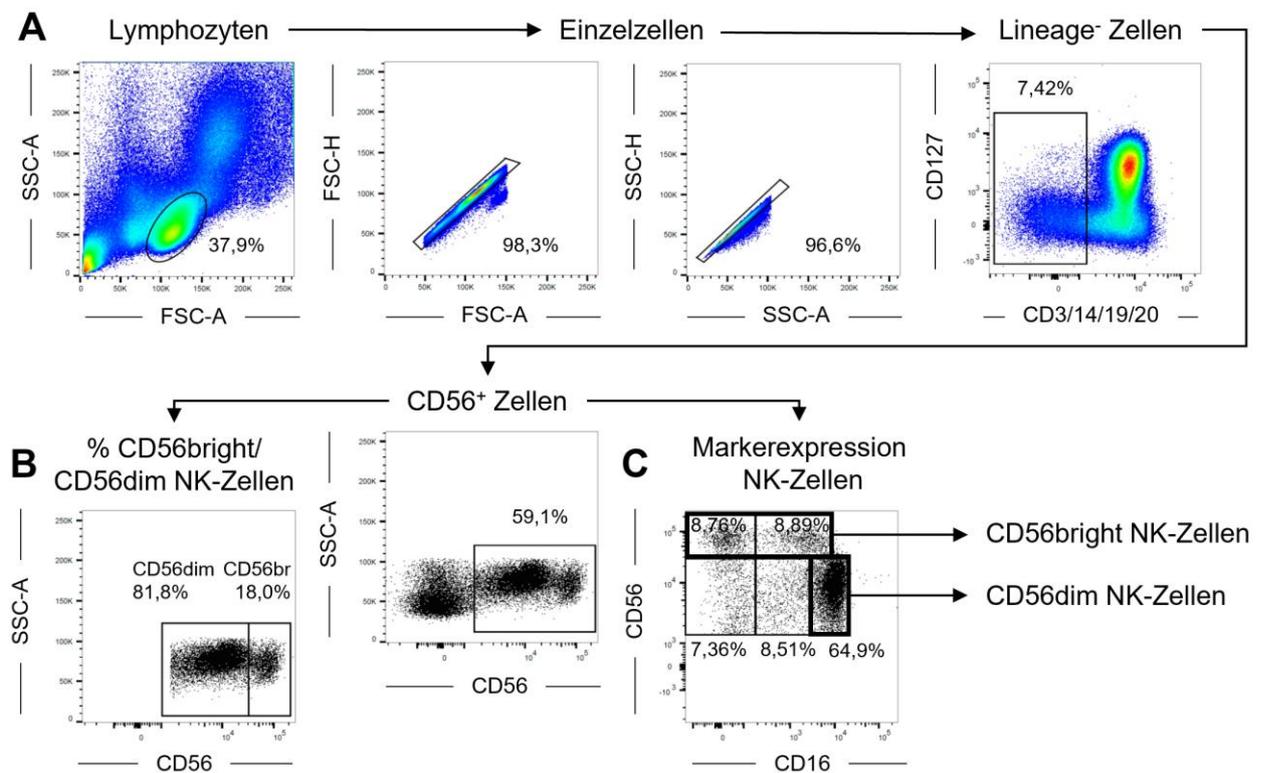
In einem integrativen Prozess aus manueller und automatisierter Analyse wurde der generierte Datensatz zum NK-Zell-Phänotyp in Bezug auf die MS-Schwangerschaft ausgewertet. Das traditionelle bivariate Gating diente einer ersten, orientierenden Analyse der bekannten NK-Zell-Populationen und ihrer Markerexpression. Mittels neuer Algorithmen des maschinellen Lernens sollten anschließend in einem automatisierten und ungebiasteten Verfahren relevante NK-Zellpopulationen im hochdimensionalen Datensatz identifiziert und visualisiert werden, um 1) die Ergebnisse der manuellen Analyse zu validieren und 2) im Sinne der Exploration bisher unerkannte Populationen mit Relevanz für die MS-Schwangerschaft zu erschließen.

### 3.4.1 Manuelle Analyse mittels sequentiell bivariaten Gatings

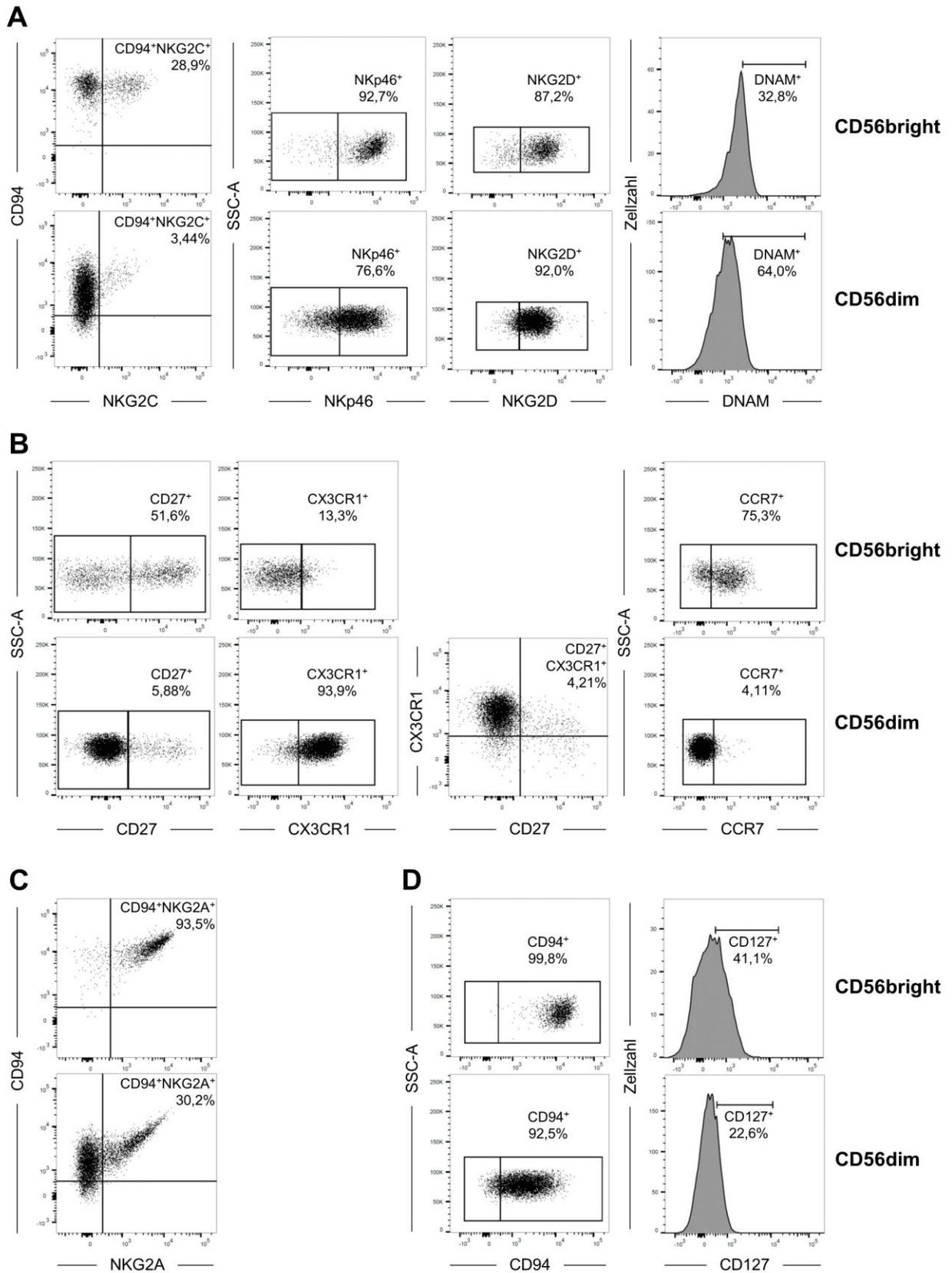
Die bivariate Analyse der kompensierten Daten erfolgte unter Verwendung der Software FlowJo. Hierbei wurden zur Definition der Zielpopulation mehrere Analysefenster (sog. ‚Gates‘) in aufeinanderfolgenden, zweidimensionalen Plots manuell gesetzt. Die Größe und Eigenschaften der auf diese Weise definierten NK-Zell-Populationen wurden durch die folgenden Maße beschrieben: prozentualer Anteil der Marker-positiven Zellen (Frequenz) und/oder geometrischer

Mittelwert der Fluoreszenzintensität (kurz ‚MFI‘) als Maß für die Expressionsdichte der biologischen Merkmale.

Die Gating-Strategie, nach der die NK-Zell-Populationen  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  innerhalb aller gemessenen PBMCs identifiziert wurden, findet sich in Abbildung 6. Die Gesamtheit der NK-Zellen wurde demnach als  $Lin^- CD56^+$  Lymphozyten definiert. Anschließend wurde die Frequenz der  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen (siehe Abbildung 6B) bestimmt. Für die subsequente Analyse des NK-Zell-Phänotyps wurden im Plot  $CD56$  gegen  $CD16$  die Subpopulationen  $CD56^{\text{bright}} CD16^{-/\text{dim}}$  und  $CD56^{\text{dim}} CD16^{\text{bright}}$  (im Folgenden als  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  bezeichnet) ausgewählt (siehe Abbildung 6C). Abbildung 7 zeigt das Gating für die einzelnen NK-Zell-Marker auf  $CD56^{\text{bright/dim}}$  NK-Zellen. Die Grenzen der Gates wurden für alle Marker mittels messtagspezifischer FMO-Kontrollen festgelegt. Da ein Fehler in der Färbung mit dem Lebend/Tot-Farbstoff bei vier der acht Patientinnen zu einem unzureichenden L/D-Signal führte, wurde aus Gründen der Einheitlichkeit auf den Ausschluss von toten Zellen verzichtet.



**Abbildung 6. Gating-Strategie zur Identifikation der NK-Zellen.** (A) Um die NK-Zellen in allen gemessenen PBMCs zu identifizieren, wurden nacheinander Lymphozyten, Einzelzellen, Lineage<sup>-</sup> Zelle und  $CD56^+$  Zellen ausgewählt. Mittels des Lineage<sup>-</sup> Gates wurden  $CD3^+$  T-Zellen,  $CD14^+$  Monozyten und B-Zellen ( $CD19/20^+$ ) ausgeschlossen. Innerhalb der  $CD56^+$  NK-Zellen wurde anschließend (B) der prozentuale Anteil der NK-Zellpopulationen  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  bestimmt sowie (C)  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  NK-Zellen für die subsequente Analyse der Expression verschiedener NK-Zell-Marker ausgewählt (fett gerahmte Gates). Die manuelle Analyse der Markerausdrückung bezieht sich somit auf  $CD56^{\text{bright}} CD16^{-/\text{dim}}$  NK-Zellen und  $CD56^{\text{dim}} CD16^{\text{bright}}$  (in den Abschnitten zur manuellen Markerausdrückung nur als  $CD56^{\text{bright}}$  und  $CD56^{\text{dim}}$  bezeichnet). Abgebildet sind repräsentative Plots. Der prozentuale Anteil bezieht sich jeweils auf die Population im vorherigen Plot.



**Abbildung 7. Analyse der Markerexpression auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.** Auf den nach Abbildung 6C definierten CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wurde die Expression von **(A)** aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren, **(B)** Maturations- und Migrationsmarkern, **(C)** eines inhibierenden NK-Zell-Rezeptors sowie **(D)** weiterer Oberflächenmoleküle analysiert. Abgebildet sind repräsentative Plots/Histogramm

jeweils für CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Der prozentuale Anteil bezieht sich jeweils auf alle CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen oder auf alle CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.

### 3.4.2 Automatisierte Analyse mittels bioinformatischer Methoden

Aus der Verwendung der multiparametrischen Durchflusszytometrie resultieren hochdimensionale Datensätze, welche nur noch begrenzt durch manuelle Methoden erfasst werden können. Der in diesem Projekt generierte Datensatz beschreibt beispielsweise jede Einzelzelle anhand von 12 verschiedenen Parametern (nach Auswahl der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten). Die Limitationen des traditionell bivariates Gating in diesem Kontext wurden in (117) zusammengefasst.

Vor diesem Hintergrund wurde das Potential des generierten Datensatzes unter Verwendung neuester Methoden aus dem Bereich der Bioinformatik (engl. *computational biology*) weiter erschlossen. Konkret kamen Algorithmen des Maschinellen Lernens (ML, engl. *machine learning*) zum Einsatz, welche anhand eines gegebenen Datensatzes Modelle erlernen, die eine zuverlässige Generalisierung der dominierenden Muster über die Beispieldaten hinaus zulassen (siehe Übersicht in (117)). Im Rahmen des Lernprozesses werden alle Parameter, die einen Datenpunkt beschreiben, simultan analysiert. Die ML-basierte Analyse in diesem Projekt folgte zwei Fragen/Zielen: *Lassen sich die Ergebnisse der manuellen Analyse mittels automatisierter Methoden bestätigen (Validierung)? Existieren weitere NK-Zell-Populationen, die in der manuellen Analyse bisher nicht aufgefallen sind, jedoch signifikante Veränderungen in Bezug auf Schwangerschaft bei MS und postpartale Phase zeigen (Exploration)?* Entsprechend wurden zwei Algorithmen ausgewählt, mittels derer jeweils beide Fragen beantwortet werden sollten.

#### *Funktionsprinzipien der verwendeten Algorithmen*

Beide Algorithmen basieren u.a. auf dem Clustering der Daten. Clustering wird zu den Methoden des nicht-supervidierten ML gezählt, mittels derer Datenpunkte (Zellen) anhand ihrer Ähnlichkeit im hochdimensionalen Raum distinkten Gruppen (sog. Clustern) zugeordnet werden. Die einzelnen Cluster setzen sich jeweils aus Zellen mit ähnlichem Marker-Profil zusammen, repräsentieren dementsprechend individuelle Zelltypen/ Populationen (117).

Der FlowSOM-Algorithmus ermöglicht das Clustering von durchflusszytometrischen Daten anhand von selbstorganisierenden Karten (SOM, engl. *self-organizing maps*), einem speziellen Typ künstlicher neuronaler Netze. Der Algorithmus setzt sich aus vier verschiedenen Analyseschritten zusammen, die in der Publikation von Van Gassen et al. detailliert beschrieben sind (118). Im Resultat repräsentieren die identifizierten Cluster und Metacluster phänotypisch distinkte Zellpopulationen, die mittels der Visualisierung in SOM-Netz und MST annotiert und hinsichtlich ihrer Markerausprägung charakterisiert werden können.

Ziel der vorliegenden Studie zum NK-Zell-Phänotyp während und nach der MS-Schwangerschaft war es, biologische Mechanismen zu identifizieren, die den protektiven Effekt der Schwangerschaft auf die autoimmune Aktivität erklären könnten. Für derartige Fragestellungen existieren Algorithmen, die der Identifikation von Biomarker – d.h. Merkmale, die mit einer bestimmten phänotypischen Kondition (z.B. erkrankt vs. gesund, schwanger vs. postpartal) assoziiert sind – dienen. Während FlowSOM lediglich ein Clustering des Datensatzes liefert und die Identifikation der für die Schwangerschaft relevanten Zellpopulationen im Nachhinein manuell erfolgen muss, ermöglicht der Algorithmus Citrus eine voll-automatisierte Biomarker-Identifikation.

Der Citrus-Algorithmus identifiziert stratifizierende Cluster in einem multiparametrischen Datensatz mittels voll-automatisierter ‚Cluster Identifikation, Charakterisierung und Regression‘ (siehe Details in (119)). Voraussetzung der Citrus-Analyse als Form des supervidierten ML ist, dass die FCS-Dateien der einzelnen Proben im Vorfeld einer der experimentellen Gruppen zugeordnet werden (d.h. in der vorliegenden Studie frühe (Tri1) vs. späte Schwangerschaft (Tri3) vs. postpartal (PP)). Nach einem initialen Clustering identifizieren regularisierte Klassifikations-Modelle (supervidierter ML-Schritt) Cluster mit stratifizierendem Verhalten, d.h. die z.B. in ihrer Zellfrequenz zwischen den experimentellen Gruppen differieren. Je nach verwendetem Modell werden diejenigen Zellcluster ausgewählt, die entweder am besten eine bestimmte experimentelle Gruppe vorhersagen (prädiktives PAM, Prediction for Microarrays) oder damit korrelieren (korrelatives SAM, Significance Analysis of Microarrays).

#### *Workflow der automatisierten Analyse*

Praktisch durchgeführt wurde die automatisierte Analyse mittels der Online-Plattform Cytobank. Der Analyse-Workflow gliederte sich in folgende Phasen: Pre-Processing der Daten, Festlegung der Algorithmus-Einstellungen, Analyse mittels Algorithmus zur Identifikation von Zellpopulationen (Clustering) und anschließender Selektion relevanter Populationen (ebenfalls automatisiert oder manuell) und Beurteilung der Ergebnisse.

Das *Pre-Processing* umfasste folgende Schritte: Die kompensierten Daten wurden im FCS-Format in Cytobank importiert, mittels Arcsin-Funktion transformiert und skaliert. Durch manuelles Pre-Gating wurden die relevanten Zellen als Startpopulation für die Analyse ausgewählt. Hierbei kam die Gating-Strategie in Abbildung 6 unter geringer Modifikation (Auswahl der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Zellen in einem Plot von CD56 gegen Lineage) und unter dem Einsatz von FMO-Kontrollen zur Anwendung. Als Startpopulation der FlowSOM-Analyse fungierten alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen, für Citrus wurden in verschiedenen Durchläufen neben den Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen auch die Subsets CD56<sup>bright/dim</sup> verwendet. Um die Variabilität der Fluoreszenzintensität zwischen den einzelnen

Proben (z.B. Batch-Effekte aufgrund des Messtags) zu minimieren, erfolgte eine per-Channel Normalisierung der Daten.

Im nächsten Schritt wurden die *Algorithmus-Parameter* festgelegt. Für beide Algorithmen wurde der Event Sampling-Modus ‚gleiche Anzahl von Events pro Probe‘ eingestellt, die einzelnen Events wurden dabei zufällig ausgewählt. Es wurden nur diejenigen Channels im Clustering verwendet, die nicht bereits im Pre-Gating zur Anwendung kamen (Ausnahme CD56). Des Weiteren wurde die Anzahl der Cluster/Metacluster für FlowSOM bzw. die minimale Clustergröße (MCS, engl. minimal cluster size) für Citrus bestimmt. Ein weiterer FlowSOM-spezifische Parameter bestand in der Anzahl der Iterationen, die angibt wie häufig ein Trainings-Datenset dem Algorithmus zur Kalkulation der SOM präsentiert wird. FlowSOM wurde standardmäßig mit 10 Iterationen durchgeführt. Für die Funktion von Citrus waren folgende weitere Einstellungen relevant: Zuordnung der einzelnen Proben zu den experimentellen Gruppen ‚frühe Schwangerschaft‘ (Tri1), ‚späte Schwangerschaft‘ (Tri3) und ‚3 Monate postpartal‘ (PP3); Auswahl des Assoziationsmodelle (PAM und SAM) und der hierfür gültigen False Discovery Rate (FDR) sowie der Anzahl der CV-Wiederholungen (nur für PAM); Charakterisierung der Cluster im Gruppenvergleich entweder anhand der Frequenz der Zellen des jeweiligen Clusters.

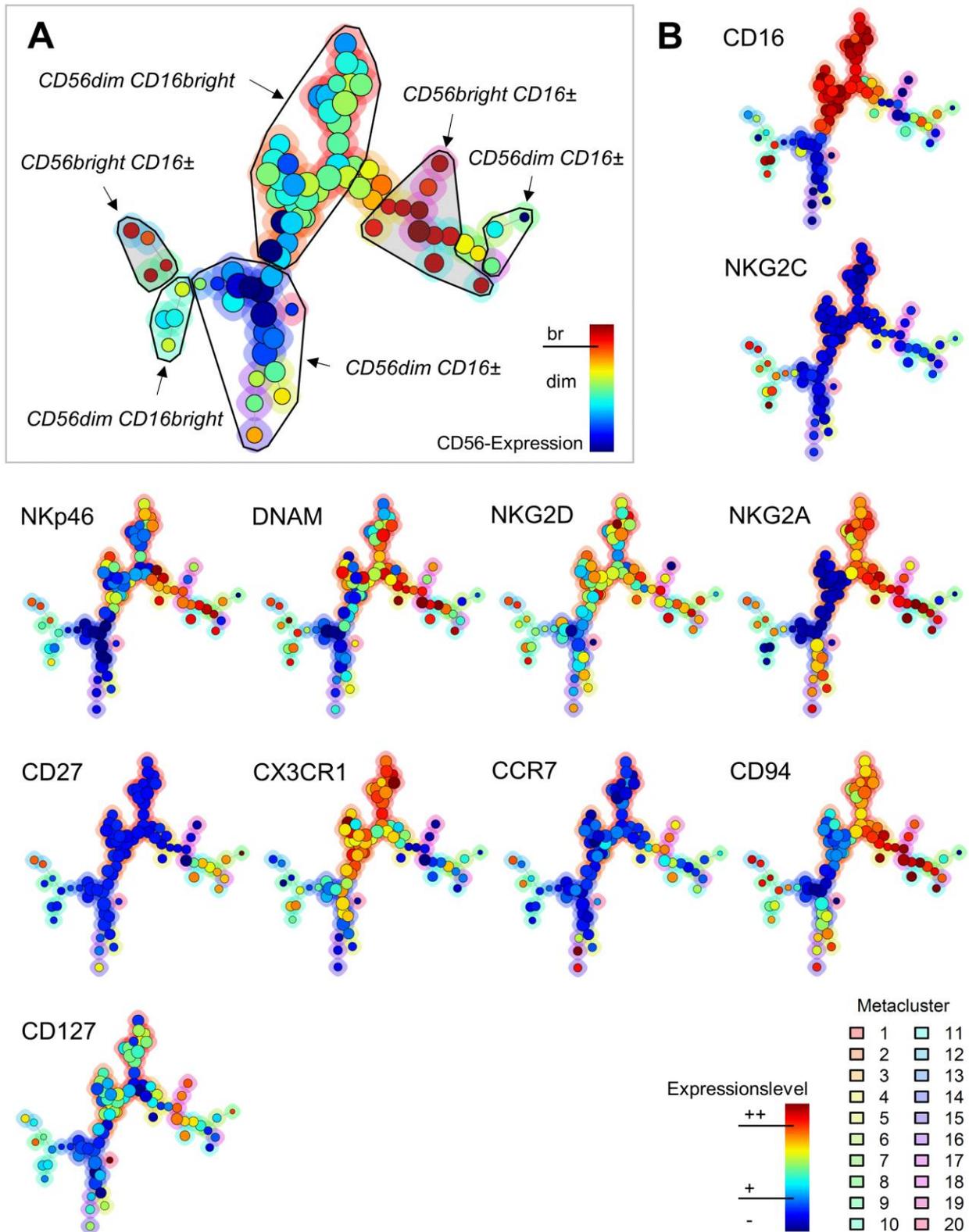
Hinsichtlich der Schritte *Populations-Identifikation* und *Selektion relevanter Cluster* unterschieden sich FlowSOM- und Citrus-Workflow. Während Citrus eine voll-automatisierten Prozess für beide Schritte bietet, wurden im Fall von FlowSOM nach dem automatisierten Clustering eine manuelle statistische Analyse notwendig.

Für die Analyse mit FlowSOM wurden die Proben der Zeitpunkte frühe (Tri1) und späte Schwangerschaft (Tri3) sowie 3 Monate postpartal (PP3) in einem Datensatz aggregiert und nach dem oben erläuterten Algorithmus analysiert. Um die optimale Repräsentation der Zellpopulationen im FlowSOM-Spannbaum zu gewährleisten, wurde eine Reihe von Durchläufen mit unterschiedlicher voreingestellter Cluster- und Metacluster-Zahl durchgeführt. Ausgewählt wurde die Anzahl, bei der die kleinste Population von Interesse durch ein Metacluster repräsentiert wurde. Dies war bei einer Cluster-Anzahl von 81 und einer Metacluster-Anzahl von 20 erreicht. Anschließend wurde die Zellfrequenz der einzelnen Metacluster je Probe (bezogen auf die analysierte Gesamtzellzahl in einer Probe) für die Selektion signifikanter Zellpopulationen exportiert. In einem manuellen, statistischen Vergleich der drei analysierten Zeitpunkte wurden die Metacluster mit signifikant veränderter Zellfrequenz identifiziert. Es wurde ein statistischer Test zum Vergleich nicht-parametrischer, gepaarter Daten verwendet.

Citrus wurde nach den obigen Parametern und Algorithmus-Schritten angewendet. Es wurden Durchläufe mit verschiedenen Startpopulationen durchgeführt und signifikante Ergebnisse ausgewählt. In Bezug auf die von Citrus verwendeten Klassifikations-Modelle ist eine

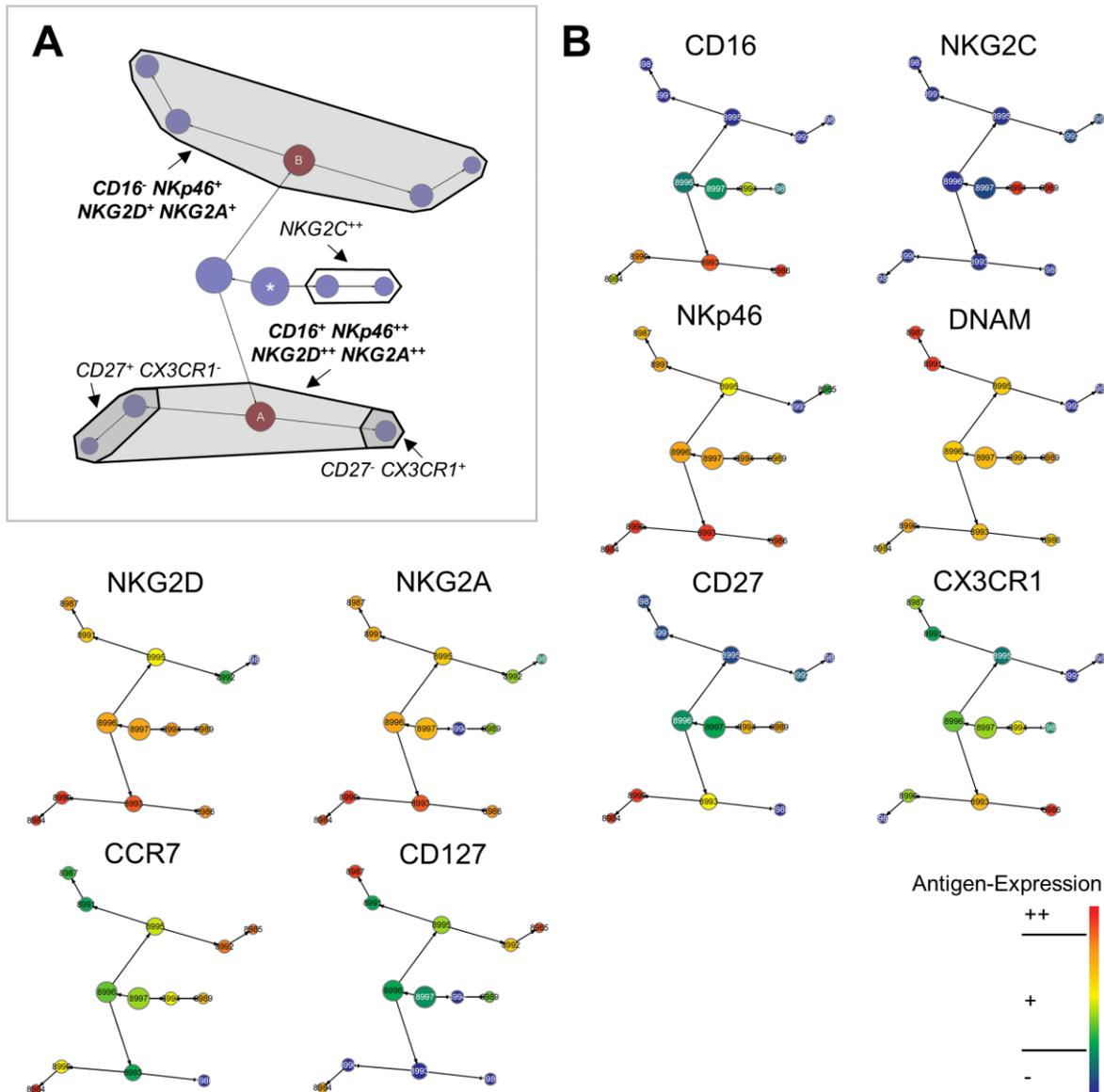
entscheidende Limitation zu beachten: das statistische Testprinzip wurde für ungepaarte Daten entwickelt. Für die Testung der gepaarten Daten des vorliegenden Projekts resultiert daher eine reduzierte Teststärke, d.h. die Wahrscheinlichkeit, dass ein Cluster keinen Unterschied zeigt, obwohl in Wahrheit ein Unterschied vorliegt, ist erhöht. Gleichzeitig bedeute dies jedoch auch, dass die von Citrus identifizierten Unterschiede mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich wahr sind.

Im letzten Schritt des Workflows erfolgte die *Beurteilung der Ergebnisse*. Hierzu wurden die identifizierten Cluster in einer nachvollziehbaren, zweidimensionalen Repräsentation visualisiert und entsprechend ihrer Zugehörigkeit zu einzelnen Zellpopulationen annotiert. Im Fall von FlowSOM wurde die Performance des Clusterings im Vergleich mit den Populationen des manuellen Gatings überprüft (siehe Kapitel 4.1.2). Alle Cluster mit signifikanten Frequenz-Unterschieden zwischen den Gruppen wurden abschließend hinsichtlich der Expression der NK-Zell-Marker charakterisiert (finale 2D-Repräsentation für FlowSOM in Abbildung 8 sowie für Citrus in Abbildung 9).



**Abbildung 8. Markerexpression der FlowSOM-Metaclustern.** Mittels FlowSOM wurden alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (vorgegatede Startpopulation) anhand der Merkmale CD56, CD16, NKG2C, NKp46, DNAM, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7, CD94 und CD127 geclustert (Details zum Workflow siehe Kapitel 3.4.2). Die einzelnen Knoten des resultierenden minimalen Spannbaums (MST) entsprechen den einzelnen Clustern (Anzahl: 81). Je näher zwei Cluster im MST verortet sind, desto ähnlicher ist die Markerexpression der enthaltenen Zellen. Die Farbe der Knoten steht für den Median der Fluoreszenzintensität von CD56

(siehe Farblegende). Die Größe der Knoten zeigt die Anzahl der Zellen in diesem Cluster (je größer, desto mehr Zellen). Die Zugehörigkeit der einzelnen Cluster zu den 20 Metacluster ist durch den farbigen Hintergrund der Knoten gekennzeichnet (siehe Legende Metacluster in B). **(A)** Annotation der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Populationen im MST anhand der Expression von CD56 und CD16. CD56<sup>bright</sup> Populationen sind grau hinterlegt. **(B)** Expression der einzelnen NK-Zell-Moleküle. Die Clusterfarbe zeigt den Median der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Markers auf den Zellen des Clusters an. Expressionslevel: (-) keine Expression; (+) schwachpositiv exprimiert (dim); (++) hochpositive exprimiert (br).



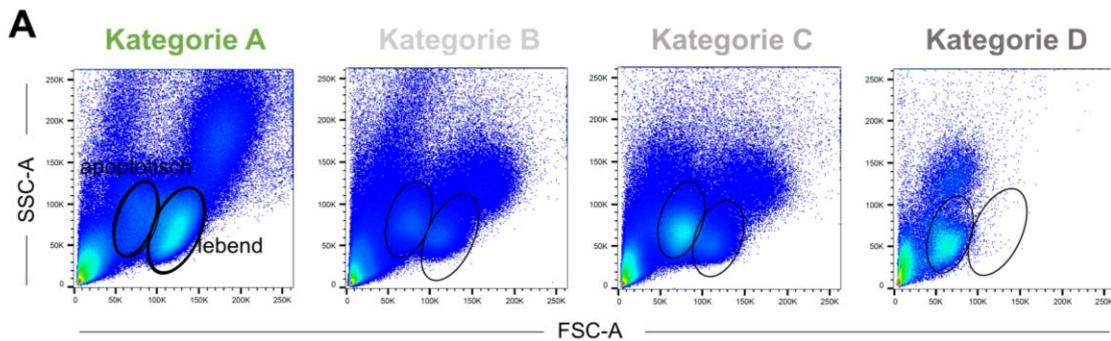
**Abbildung 9. Markerexpression der Citrus-Cluster.** Die Citrus-Analyse umfasste das automatisierte Clustern der Startpopulation CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen anhand der in (B) aufgeführten NK-Zell-Moleküle und die anschließende Bestimmung von Clustern, deren Zellfrequenz zwischen den experimentellen Gruppen Tri1, Tri3 und PP3 signifikant variierte (bei einer false discovery rate (FDR) von 1%). Hierzu wurde das korrelative Assoziationsmodell SAM verwendet. **(A)** Hierarchische Organisation der CD56<sup>bright</sup> Cluster im Citrus-Baum. Die Baumstruktur ist hierarchisch und redundant organisiert, d.h. ein Cluster enthält jeweils alle Zellen der Cluster, die nach seiner dichotomen Auftrennung folgen. Die stratifizierenden Cluster A und

B mit signifikanten Unterschieden ihrer Zellfrequenz zwischen den Gruppen sind rot gefärbt. **(B)** Expression der einzelnen NK-Zell-Moleküle. Die Clusterfarbe zeigt den Median der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Markers auf den Zellen des Clusters an. Expressionslevel: (-) keine Expression; (+) schwachpositiv exprimiert (dim); (++) hochpositive exprimiert (br). Die Farbcodierung der Expression von CD16, CX3CR1 und CD127 als (++) oder (+) ist immer als schwachpositiv zu werten, da diese Moleküle generell nicht hochpositiv auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert werden.

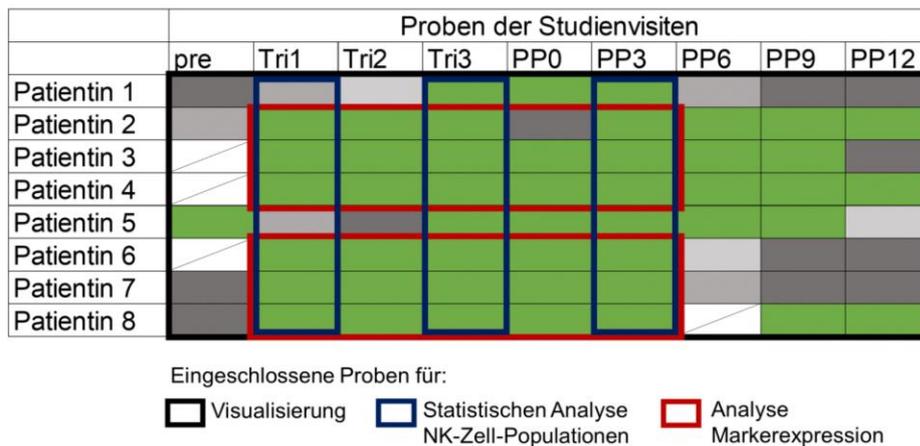
### 3.4.3 Probenqualität und Konsequenzen für die Datenanalyse

Eine entscheidende Herausforderung für die Datenanalyse bestand in der stark variablen Qualität des kryopreservierten Zellmaterials. Ein Teil der Proben, welche jeweils zu den einzelnen Studienvisiten gewonnen wurden, wies eine erheblich reduzierte Zellviabilität auf; in einzelnen Proben waren lediglich tote Zellen nachweisbar.

Um die Auswirkungen der verminderten Probenqualität auf die durchflusszytometrischen Ergebnisse zu beurteilen, wurde die Zellviabilität jeder gemessenen Einzelprobe klassifiziert. Weil die Verwendung des L/D-Signals aufgrund einer fehlerhaften Färbung nicht für alle Proben zuverlässig war, wurde auf die Informationen im FSC/SSC-Plot zurückgegriffen. Auch wenn diese Methode weniger exakt als die Verwendung von fluoreszierenden L/D-Farbstoffen ist, lässt sich hiermit dennoch eine zuverlässige Aussage zur zellulären Viabilität treffen (99). Apoptotische Zellen weisen hiernach ein reduziertes FSC-Signal bei gleichzeitig leicht erhöhtem SSC-Signal auf, sodass sich apoptotische von lebenden Lymphozyten unterscheiden lassen (siehe getrennte Populationen in Abbildung 10A). Das Verhältnis von lebenden zu apoptotischen Lymphozyten wurde nach optischer Beurteilung des FSC/SSC-Plots in vier Kategorien eingeteilt (siehe Abbildung 10A). Anhand dieser Einteilung der Einzelproben zeigte sich folgender Zusammenhang: Je geringer die Probenqualität, d.h. je höher der Anteil apoptotischer Zellen in einer Probe, desto geringer auch die Fluoreszenzintensität (Expression) der gemessenen Marker auf den NK-Zellen innerhalb der lebenden Lymphozyten. Ein Ausschluss der toten Zellen innerhalb der lebenden Lymphozyten-Population (getestet in den Proben mit funktionierender L/D-Färbung) veränderte diesen Zusammenhang nicht. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass bei geringer Probenqualität auch in der Lebend-Fraktion vermehrt geschädigte Zellen auftreten, die bei intakter Zellmembran noch nicht mit dem L/D-Farbstoff markiert werden, aber bereits ihre Molekülexpression ändern (siehe Batch-Effekt aufgrund von erhöhtem Zelltod, in (99)).



**B**



**Abbildung 10. Probenqualität.** (A) Lebende und apoptotische Lymphozyten sind mit einem elliptischen Gate gekennzeichnet. Jede Probe wurde hinsichtlich der Zellviabilität beurteilt und anhand des Verhältnisses von lebenden zu apoptotischen Lymphozyten (FSC/SSC-Plot) einer der folgenden Kategorien zugeordnet: *Kategorie A* (Grün), überwiegend lebende Zellen; *Kategorie B* (helles Grau), gleicher Anteil von lebenden und apoptotischen Zellen; *Kategorie C* (mittleres Grau), mehr apoptotische als lebende Zellen; *Kategorie D* (dunkles Grau), lediglich tote Zellen. (B) Die einzelnen Felder stehen jeweils für eine Probe. Die Feldfarbe zeigt die Probenqualität nach den in (A) definierten Kategorien. Die farbigen Rahmen markieren, welche Proben in welchen Analyseabschnitt eingeschlossen wurden (siehe Legende).

Um trotz variabler Probenqualität die Vergleichbarkeit der Ergebnisse über den gesamten longitudinalen Studienverlauf zu gewährleisten, wurde vor Beginn der Analyse zu jedem Analyseabschnitt ein Cut-off für die erforderliche Probenqualität festgelegt. Hierzu wurde das Verhältnis Lebend/Apoptotisch (siehe Kategorien in Abbildung 10A) verwendet. Es wurde nur Proben in den jeweiligen Analyseabschnitt eingeschlossen, die diese Anforderung erfüllten (Abbildung 10B; Tabelle 13). Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die beobachteten MFI-Veränderungen auf einen biologischen Effekt und nicht lediglich auf die wechselnde Viabilität der Zellen zurückzuführen sind.

**Tabelle 13.** Cut-off-Kriterien zur Probenqualität

Analyseabschnitt	Cut-off für das Verhältnis Lebend/Apoptotisch
<i>Manuelle Analyse</i>	
Frequenz Gesamt-NK-Zellen/ CD127 <sup>+</sup> CD56 <sup>-</sup> Zellen	Kategorie C <i>oder</i> besser
Frequenz CD56 <sup>bright/dim</sup> <sup>1</sup>	Kategorie C <i>oder</i> besser
Markerexpression auf NK	nur Kategorie A
<i>Automatisierte Analyse</i> <sup>2</sup>	
Kalkulation FlowSOM (MST)	Kategorie C <i>oder</i> besser
Citrus	Kategorie C <i>oder</i> besser

Definition der Kategorien siehe Abbildung 10A. <sup>1</sup> Es konnten auch Proben mit geringerer Qualität einbezogen werden, da die Unterscheidung zwischen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Population (Gating nach Abbildung 6B) auch bei qualitäts-bedingt reduzierter MFI für CD56 möglich war. <sup>2</sup> Weil im Vorfeld der automatisierten Analyse die Daten hinsichtlich der Variation der Fluoreszenzintensität per Channel normalisiert wurden, konnten auch hier zwei Proben der Kategorie C eingeschlossen werden (ansonsten nur Kategorie A). Lediglich für den kritischen Schritt der Kalkulation der selbstorganisierenden Karte in FlowSOM wurden nur Proben der Kategorie A verwendet.

### 3.5 Statistik

Im Rahmen der Studienplanung wurde die statistische Methodik festgelegt. Eine Normalverteilung der intervallskalierten Daten wurde nicht angenommen. Entsprechend dieser Voraussetzungen wurde ein nicht-parametrischer Signifikanztests für mehr als zwei verbundene Stichproben ausgewählt, um Unterschiede zwischen den Stichproben (Zeitpunkten) nachzuweisen.

Nach der Beurteilung der Probenqualität und dem Ausschluss von Proben mit geringer Qualität (siehe Kapitel 3.4.3) musste diese statistische Analysestrategie angepasst werden. Aufgrund fehlender Werte im Datensatz (siehe Abbildung 10B) war die Durchführung eines Tests für verbundenen Stichproben mit Messwiederholung nicht möglich. Sämtliche gemessene Merkmale wurden daher nach der folgenden Systematik getestet: Vergleich zwischen den Stichproben frühe Schwangerschaft (Tri1) vs. späte Schwangerschaft (Tri3) *und* späte Schwangerschaft (Tri3) vs. 3 Monate postpartal (PP3) anhand des nicht-parametrischen Tests für zwei verbundene Stichproben (Wilcoxon-Test). Alle weiteren Zeitpunkte wurden in den Abbildungen dieser Monografie – mit dem Ziel der Visualisierung – ebenfalls gezeigt, jedoch statistisch nicht miteinander verglichen.

### 3.5.1 Wilcoxon-Test

Mit dem Wilcoxon-Test (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) kann überprüft werden, ob ein Unterschied der zentralen Tendenz zwischen zwei verbundenen Stichproben vorliegt. Eine Normalverteilung der Zielgröße wird nicht vorausgesetzt, es handelt sich um einen nicht-parametrischen Test. Die Berechnung der Teststatistik basiert dabei auf der Zuordnung von Rängen entsprechend der Differenz der Werte eines jeden Messpaares. Soweit nicht anders angegeben beziehen sich die Ergebnisse der Wilcoxon-Tests für Effekte während Schwangerschaft auf den Vergleich Tri1 vs. Tri3 und für Effekte der postpartalen Phase auf den Vergleich Tri3 vs. PP3. Das Signifikanzniveau wurde a priori auf  $\alpha=0,05$  festgelegt. Bei einem p-Wert  $< 0,05$  wurde die Nullhypothese (kein Unterschied) zugunsten der Alternativhypothese (Unterschied vorhanden) abgelehnt. Statistische Signifikanz wurde wie folgt markiert:  $p<0,05$ ,\* und  $p<0,01$ ,\*\*.

Die Kalkulation der Tests sowie der deskriptiven Statistik erfolgt mit der Software GraphPad Prism und SPSS. Die Effektstärken (Cohen's d) wurden unter Zuhilfenahme des Online-Tools Psychometrica (120) berechnet und wie folgt interpretiert:  $d=0,2$  bis  $0,5$  kleiner Effekt;  $d=0,5$  bis  $0,8$  mittlerer Effekt;  $d\geq 0,8$  großer Effekt (121).

### 3.5.2 Multiples Testen

Zur Untersuchung des NK-Zell-Phänotyps während und nach der MS-Schwangerschaft wurde eine Vielzahl von Hypothese getestet. Hieraus ergibt sich eine versuchsbezogene Irrtumswahrscheinlichkeit – d.h. die Wahrscheinlichkeit mindestens einer der getesteten Nullhypothesen abzulehnen, obwohl diese wahr ist – die nicht mehr durch Einhaltung des lokalen Signifikanzniveau  $\alpha$  kontrolliert wird. Diesem Problem kann durch eine Korrektur für multiples Testen begegnet werden (122).

Die p-Werte der Analyse zur Zellfrequenz von CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Population wurde mittels Bonferroni-Methode korrigiert. Darüber hinaus wurde aufgrund des explorativen Charakters der Analyse der Markerexpression keine formale Adjustierung für multiples Testen vorgenommen (siehe Empfehlung in (122)). Stattdessen wurden die Tests auf die wissenschaftlich relevantesten Vergleiche (d.h. Tri1 vs. Tri3, Tri3 vs. PP3) begrenzt und statistisch signifikante Ergebnisse unter dem Vorbehalt der Exploration interpretiert. Im Rahmen des Vorbehalts bei dieser explorativen Studie gilt überdies, dass eine Validierung der Ergebnisse in weiteren, unabhängigen Studien zwingend notwendig ist.

### 3.6 Angaben zu Kollaborationen

Die hier verwendeten demografischen, klinischen und radiologischen Patientinnen-Daten sowie das kryopreservierte Zellmaterial wurden durch die AG Klinische Neuroimmunologie (Leiter: Prof. Dr. Friedemann Paul), NeuroCure Clinical Research Center (NCRC), Charité – Universitätsmedizin Berlin, bereitgestellt. Die demografischen/klinischen Daten wurden selbstständig aus den bereitgestellten Clinical Research Files extrahiert und analysiert. Die Daten zu Anzahl und Volumen der T2-gewichteten MRT-Läsionen wurden von den Mitarbeitenden des NCRC generiert und ausgewertet und von mir visualisiert und statistisch analysiert (betrifft Ergebnisse in Kapitel 4.3).

Das Antikörper-Panel wurde in Kollaboration mit der Firma Biolegend und dem Dipl.-Biol. Mathias Streit, Leiter der Core Facility Flow Cytometry des Instituts für Medizinische Immunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin, erstellt. Die Firma Biolegend stellte die Antikörperkonjugate auf Grundlage der von mir vorgegebenen NK-Zell-Marker zusammen. Die Etablierung, Testung und Fehlerbehebung wurden selbstständig durchgeführt. Dipl.-Biol. Mathias Streit wurde bei komplexen Problemen beratend hinzugezogen.

In Fragen der automatisierten Analyse des durchflusszytometrischen Datensatzes wurde Dr. Stephan Schlickeiser, Bioinformatiker am Institut für Medizinische Immunologie, beratend hinzugezogen. Sämtliche Analyseschritte vom Pre-Processing bis zur Beurteilung der Ergebnisse führte ich wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben selbstständig durch. Die jeweils in Abbildung 18, Abbildung 24 und Abbildung 25 gezeigte Heatmap, die der Visualisierung der Markerepression der einzelnen FlowSOM-Metacluster dient, wurde von Dr. Schlickeiser mittels der Software R erstellt.

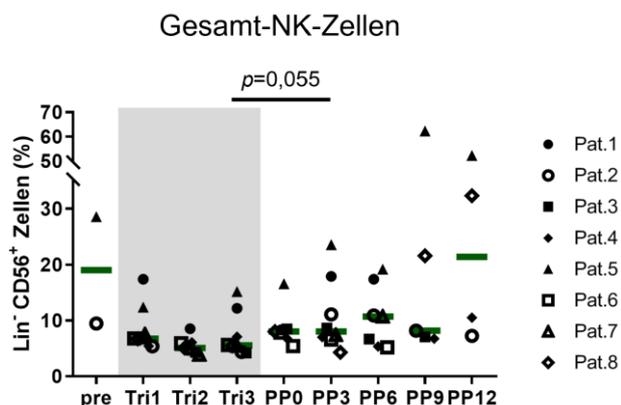
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen während und nach der Schwangerschaft bei MS

#### 4.1.1 Anteil der angeborenen lymphatischen Zellen

##### *Unveränderter Anteil der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen*

Um in einem ersten Schritt die grundlegende Entwicklung des gesamten NK-Zell-Kompartiments im peripheren Blut der acht MS-Patientinnen (n=8) zu verfolgen, wurde der prozentuale Anteil der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten-Population untersucht (siehe Abbildung 11 und ausführliche Statistik in Tabelle 14). Im Vergleich der Zeitpunkte frühe gegen späte Schwangerschaft (Tri1 vs. Tri3) zeigte sich keine signifikante Veränderung der Frequenz der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen. Drei Monate postpartal wurde ein nicht-signifikanter Trend hin zu einem Anstieg der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Mediane: 5,54% (Tri3) vs. 8,03% (PP3), p=0,055) beobachtet.



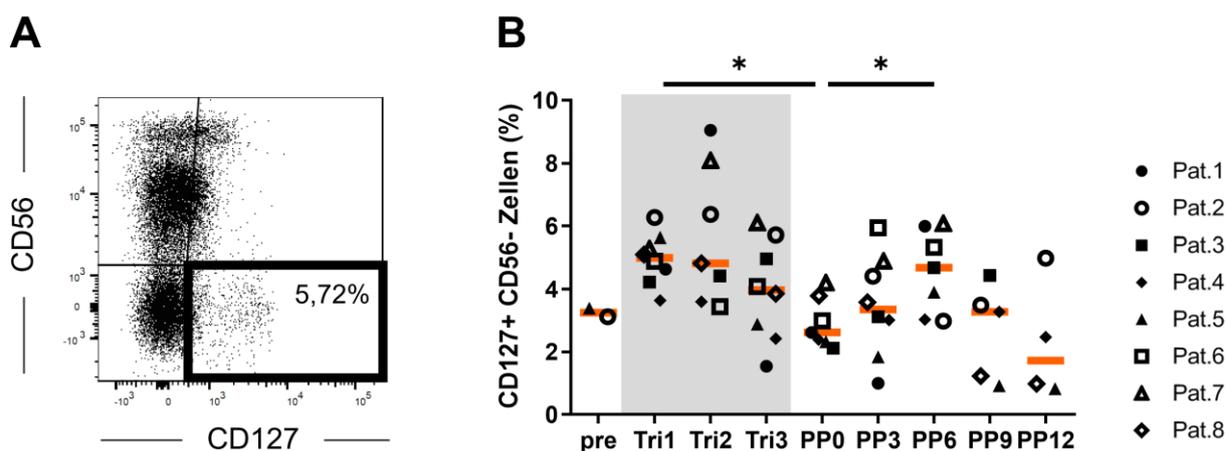
**Abbildung 11. Frequenz der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen innerhalb der Lymphozyten.** Frequenz der als Lineage<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> definierten Gesamt-NK-Zellen an der Doubletten-bereinigten Lymphozyten-Population (Gating siehe Abbildung 6A). Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Gezeigt werden dabei nur Datenpunkte von Messungen, die die Kriterien der Probenqualität erfüllen (siehe Kapitel 3.4.3). Studienzeitpunkte: vor der Schwangerschaft (pre), während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3, 6, 9 und 12 Monate nach Entbindung (PP3-12).

##### *Abweichendes Muster der Veränderungen des Anteils der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen*

Neben den NK-Zellen zirkulieren im peripheren Blut noch weitere Subgruppen der ILCs, jedoch in weitaus geringerem Anteil ( $\leq 2\%$  aller ILCs des peripheren Bluts). Hierzu zählen ILC2s und NKp44<sup>-</sup> ILC3s (2, 123). Wie sich die Proportionen dieser ILC-Subgruppen im peripheren Blut

während der Schwangerschaft bei Gesunden bzw. MS-Patientinnen verhalten, ist bisher nicht untersucht worden. Zwecks einer ersten Orientierung wurde in dieser Studie anhand des pan-ILC-Markers CD127 der Anteil der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen im peripheren Blut der acht MS-Patientinnen bestimmt (n=8). Es zeigte sich keine Veränderung der Frequenz der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten während und nach der Schwangerschaft (Tabelle 14). Dies galt zumindest für die statistischen Tests nach dem geplanten Vergleichsschema. Allerdings fiel der Anteil der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen vom ersten Trimester (Median: 4,89%) zum ersten Monat nach der Geburt (Median: 2,62%) signifikant ab ( $p=0,016$ ), gefolgt von einem signifikanten Anstieg zur Visite 6 Monate postpartal (Median: 5,0%;  $p= 0,031$ ; siehe Abbildung 12).

Die CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen wurden absichtlich nicht als ILC2/3 bezeichnet, da aufgrund des vorrangigen Ziels der Studie NK-Zellen zu phänotypisieren, auf die Vollständigkeit des Lineage-Mix zur Bestimmung der ILC2/3s (siehe Anforderung in (123)) verzichtet wurde. Die Ergebnisse sind daher unter dem Vorbehalt einer möglichen Kontamination durch andere CD127<sup>+</sup> Zellen (z.B. Basophile) zu interpretieren.



**Abbildung 12. Frequenz der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten. (A)** Gating der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen (repräsentativer Plot). Der abgebildete Plot zeigt alle Lineage-Doubletten-bereinigten Lymphozyten entsprechend des Gatings in Abbildung 6A. Um die Frequenz der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten zu bestimmen, wurde das untere, rechte Quadranten-Gate (fett gerahmt) ausgewählt. **(B)** Frequenz der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>-</sup> Zellen innerhalb der Lin<sup>-</sup> Lymphozyten. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. PP0 (n=7) und PP0 vs. PP6 (n=6) erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (\*,  $p$ -Wert<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Gezeigt und analysiert wurden dabei nur Datenpunkte von Messungen, die die Kriterien der Probenqualität erfüllen (siehe Kapitel 3.4.3) Studienzeitpunkte: vor der Schwangerschaft (pre), während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3, 6, 9 und 12 Monate nach Entbindung (PP3-12).

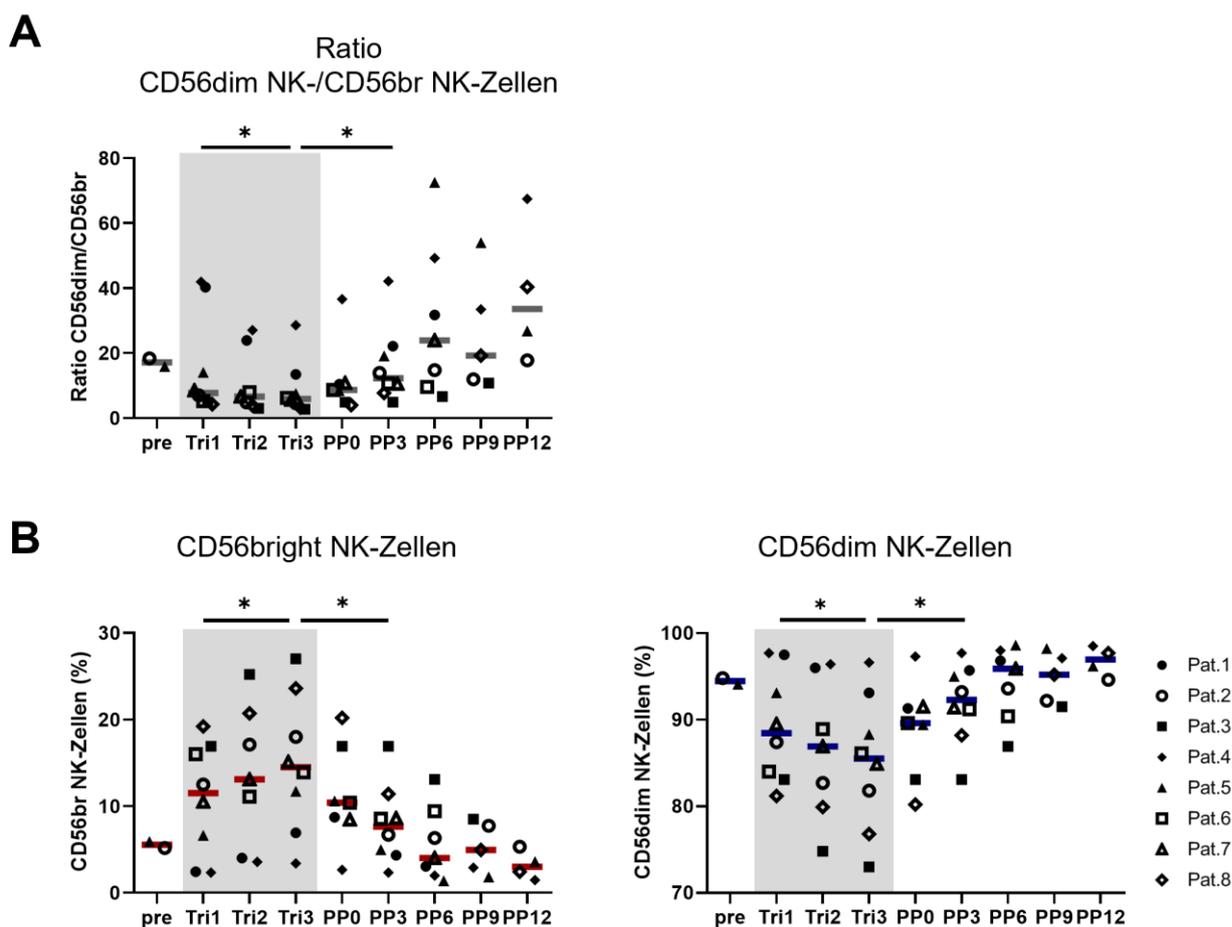
#### 4.1.2 Veränderung der klassischen NK-Zell-Populationen CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup>

Die Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen – CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als Subset mit immunregulatorischen Funktionen und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen als zytotoxische Effektoren – standen im Fokus des nächsten Analyseabschnitts. Ihr Anteil innerhalb aller CD56<sup>+</sup> NK-Zellen wurde mittels manueller und automatisierter Methodik ausgewertet.

##### *Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der MS-Schwangerschaft gefolgt von einer postpartalen Reduktion*

Für einen ersten Überblick wurde das Verhältnis der Frequenz der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zur Frequenz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen erfasst (n=8, siehe Abbildung 13A). Die Ratio CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> fiel im Verlauf der Schwangerschaft ab (Median Tri1 vs. Tri3: 7,76 vs. 5,91; adjustiertes p=0,031) und stieg anschließend in der frühen postpartalen Phase wieder an (Median PP3: 12,3; adjustiertes p=0,016; siehe ausführliche Statistik in Tabelle 14). Beide Effekte waren der Effektstärke d nach Cohen zufolge als groß zu bewerten (d=1,48 und d=1,63 für Schwangerschaft und Postpartum).

Worauf sich anhand der Entwicklung der Ratio CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> bereits schließen ließ, wird in Abbildung 13B verdeutlicht. Während der Schwangerschaft bei MS nahm der Anteil der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen innerhalb aller CD56<sup>+</sup> NK-Zellen vom ersten zum dritten Trimester um 4,53% zu (mediane Paardifferenz, 95% Konfidenzintervall (KI) [1,21; 7,31]; adjustiertes p=0,047; große Effekt mit d=1,35; ausführliche Statistik siehe Tabelle 14). Innerhalb der ersten drei Monate postpartal folgte eine Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz um 6,68% (mediane Paardifferenz, 95% KI [-10,7; -3,77]; adjustiertes p=0,016; d=1,62). Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zeigten ein inverses Muster. Vom ersten zum dritten Trimester der Schwangerschaft nahm die Frequenz der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ab (mediane Paardifferenz: -4,5%, 95% KI [-7,25; -1,15]; adjustiertes p=0,047; d=1,35), um postpartal wieder anzusteigen (mediane Paardifferenz: 6,65%, 95% KI [3,8; 10,75]; adjustiertes p=0,016; d=1,63).



**Abbildung 13. Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> im Kontext der Schwangerschaft bei MS.** Die Frequenz der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen innerhalb aller Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen wurde mittels Gating bestimmt (siehe Abbildung 6A und B). **(A)** Verhältnis von CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Frequenz zur CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz. **(B)** Frequenz der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen einzeln betrachtet. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die p-Werte wurden mittels Bonferroni-Methode adjustiert (\*, p<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median (farbige Linie), wobei nur Datenpunkte von Messungen gezeigt werden, die die Kriterien der Probenqualität erfüllen (siehe Kapitel 3.4.3.). Studienzeitpunkte: vor der Schwangerschaft (pre), während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft (grau hinterlegt) und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3, 6, 9 und 12 Monate nach Entbindung (PP3-12).

*Schwangerschaftsbezogener Shift der Subsets CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> bestätigt sich in automatisierter Analyse*

Zur weiteren Überprüfung des beobachteten CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> Shifts kam der nicht-supervidierten Machine Learning-Algorithmus FlowSOM zum Einsatz. Die Analyse folgte der Rationale: Wenn die Verschiebungen der NK-Zell-Populationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> hinreichend robust sind, so würden sich diese auch in einer automatisierten, weniger von Bias beeinflussten Analyse bestätigen. FlowSOM identifiziert Zellpopulationen mittels Clustering. Unter Verwendung von selbstorganisierenden Karten (SOM, engl. self-organizing maps) und einem zusätzlichen Metaclustering-Schritt werden die Zellen nach ihrer Ähnlichkeit im

hochdimensionalen Datenraum in Clustern gruppiert. Als Startpopulation für das FlowSOM-Clustering wurden die Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen ausgewählt. Alle prozentualen Angaben beziehen sich auf diese Startpopulation. Als Dimensionen, anhand derer die Zellen geclustert wurden, dienten die gemessenen NK-Zell-Merkmale CD56 und CD16 sowie alle weiteren NK-Zell-Marker. Details zur Methodik und dem angewendeten Workflow finden sich in Kapitel 3.4.2 .

Vor Beginn der statistischen Analyse der FlowSOM-Ergebnisse wurde die Performance des Clusterings mit Blick darauf evaluiert, wie exakt die Metacluster die klassischen NK-Zellpopulationen repräsentierten. Hierzu wurde die Visualisierung der Metacluster im MST (Minimum Spanning Tree) verwendet. In einem ersten manuellen Annotations-Schritt wurden die Metacluster entsprechend ihrer CD56- und CD16-Expression den klassischen NK-Zellpopulationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> zugeordnet (siehe CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>±</sup>, CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>±</sup> in Abbildung 8 und Abbildung 14A). Anschließend erfolgte der Vergleich des Clusterings mit dem manuellen Gating. Dabei wurde die Homogenität der Zellen innerhalb der einzelnen Metacluster anhand der Kreisdiagramme in Abbildung 15 beurteilt, welche den Anteil der manuell gateden NK-Zellpopulationen CD56<sup>bright</sup> (aufgeteilt in CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> und CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup>) und CD56<sup>dim</sup> (aufgeteilt in CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>br</sup>, CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>dim</sup>, CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup> identisch zum Gating in Abbildung 6C) für jedes Cluster des MST anzeigten. Es zeigte sich, dass die Metacluster ganz überwiegend homogen zusammengesetzt waren, also entweder CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen enthielten. Das hohe Maß an Übereinstimmung von automatisierten Clustering und manuellem Gating gewährte somit eine zuverlässige Repräsentation der klassischen NK-Zellpopulationen durch die Metacluster und die Annotation des MSTs.

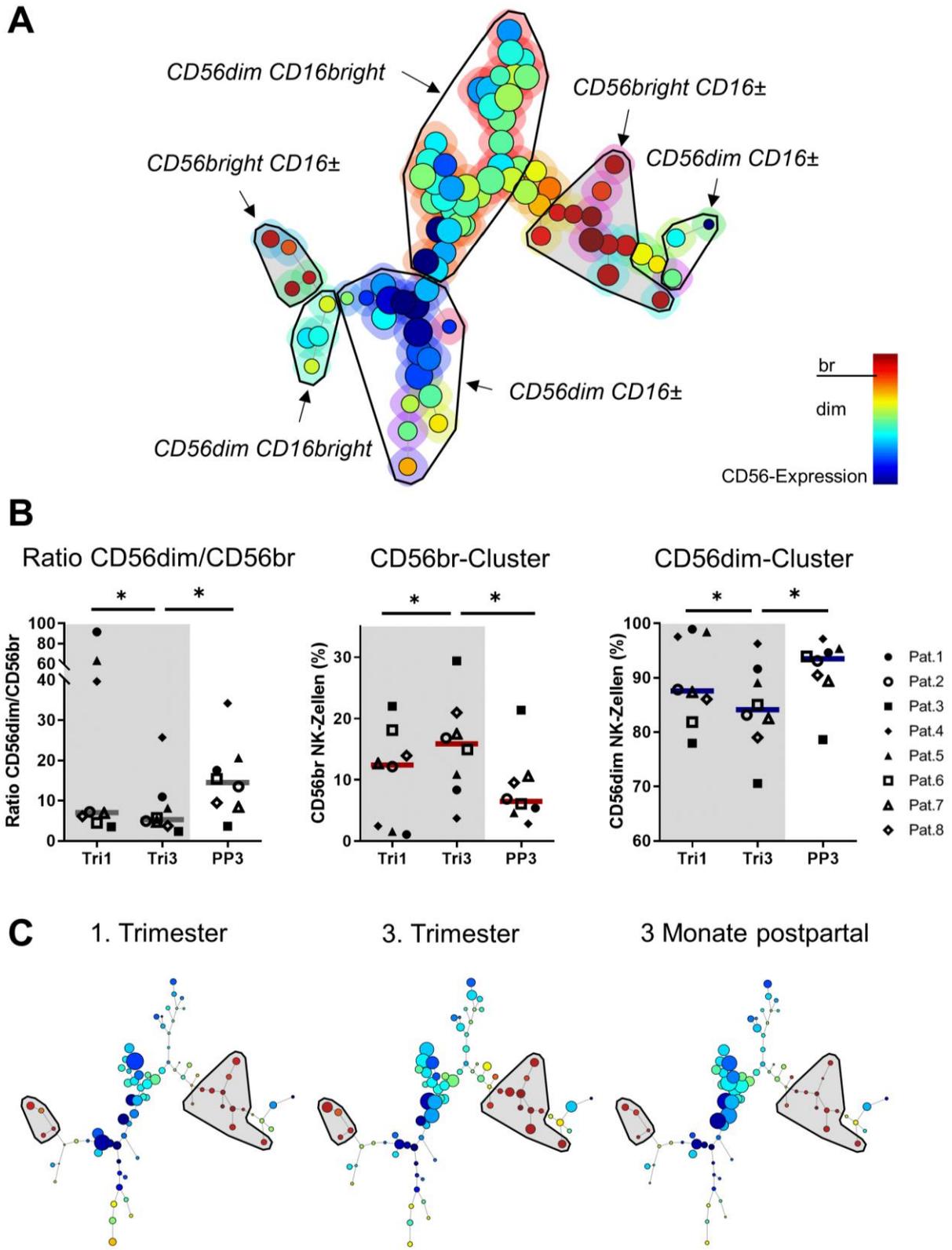
Auf dieser Basis konnten die schwangerschaftsabhängigen Veränderungen der NK-Zellpopulationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> auch anhand der FlowSOM-Ergebnisse nachvollzogen werden (siehe Abbildung 14). Die Frequenzen der Metacluster innerhalb der Startpopulation Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen wurden entsprechend ihrer Annotation als CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> addiert. Hieraus ergab sich die Gesamtfrequenz der CD56<sup>bright</sup> Population (d.h. aller CD56<sup>bright</sup> Metacluster), der CD56<sup>dim</sup> Population sowie die daraus bestimmte Ratio CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup>.

Konsistent mit den Ergebnissen der bivariaten Analyse, fand sich mittels FlowSOM eine Reduktion der Ratio CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> in der Schwangerschaft (Median Tri1 vs. Tri3: 7,06 vs. 5,32; adjustiertes p=0,046) und ein subsequenter Anstieg in der postpartalen Phase (Median PP3: 14,49; adjustiertes p=0,016; siehe Abbildung 14B und ausführliche Statistik in Tabelle 14). Während die Frequenz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, repräsentiert durch die entsprechenden Cluster, vom ersten zum dritten Schwangerschaftstrimenon stieg (mediane Paardifferenz: 5,58%; adjustiertes p=0,046), fiel der Anteil der CD56<sup>dim</sup> in diesem Zeitraum in entsprechender Weise (adjustiertes p=0,046). Postpartal zeigte sich – ebenfalls in Übereinstimmung mit der manuellen

Analyse – eine Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz (mediane Paardifferenz: -7,19%; adjustiertes p=0,016) sowie eine Erhöhung der CD56<sup>dim</sup> (adjustiertes p=0,008). Alle Effektstärken für die beschriebenen Unterschiede wurden als groß eingestuft (siehe Tabelle 14). Anhand der Visualisierung in Abbildung 14C (repräsentative Daten einer Patientin) lässt sich anschaulich die Expansion der CD56<sup>bright</sup> in der Schwangerschaft und die anschließende postpartale Reduktion des Subsets nachvollziehen.

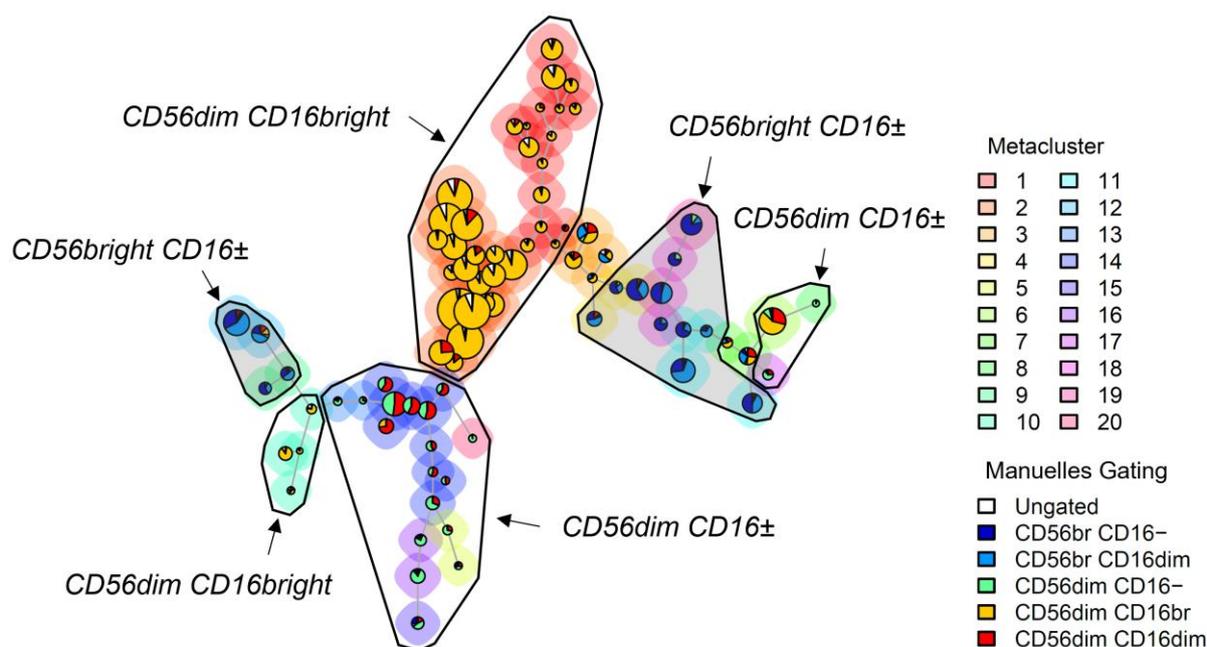
#### *Zwischenfazit*

Die Ergebnisse der manuellen und automatisierten Analyse vermittelten ein kohärentes Bild der Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen während und nach der Schwangerschaft bei MS. Während die Schwangerschaft von einer Expansion des regulatorischen NK-Zell-Subsets CD56<sup>bright</sup> und einer Reduktion der zytotoxischen Effektor-NK-Zellen CD56<sup>dim</sup> geprägt war, zeigte sich in der postpartalen Phase eine deutliche Abnahme der CD56<sup>bright</sup> sowie Zunahme der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Evidenz für die beschriebenen NK-Zell-Shifts lieferte hierbei nicht nur die manuelle Analyse. Mittels FlowSOM-Algorithmus gelang die automatisierte Konfirmation der Effekte, wobei sich die Ergebnisse beider Analyseansätze als hochgradig konsistent erwiesen. Zudem standen die Beobachtungen zu den NK-Zell-Populationen im Einklang mit der bisherigen Fachliteratur sowie der unveröffentlichten Voruntersuchung unserer Arbeitsgruppe.



**Abbildung 14. Klassische NK-Zell-Populationen  $CD56^{bright}$  und  $CD56^{dim}$  analysiert mit dem FlowSOM-Algorithmus.** Mittels FlowSOM wurden alle Lin<sup>-</sup>  $CD56^{+}$  NK-Zellen (vorausgewählte Startpopulation) anhand der Merkmale CD56, CD16, NKG2C, Nkp46, DNAM1, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7, CD94 und CD127 geclustert (Details zum Workflow siehe Kapitel 3.4.2). Die einzelnen Knoten des resultierenden minimalen Spannbaums (MST) entsprechen den einzelnen Clustern (Anzahl:

81). Je näher zwei Cluster im MST verortet sind, desto ähnlicher ist die Markerexpression der enthaltenen Zellen. Die Farbe der Knoten steht für den Median der Fluoreszenzintensität von CD56 (siehe Farblegende). Die Größe der Knoten zeigt die Anzahl der Zellen in diesem Cluster (je größer, desto mehr Zellen). Die Zugehörigkeit der einzelnen Cluster zu den 20 Metacluster ist durch den farbigen Hintergrund der Cluster-Knoten gekennzeichnet (Legende in Abbildung 15). **(A)** Verschiedene CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Populationen im MST. Die verschiedenen Populationen wurden anhand ihrer Expression von CD56 und CD16 annotiert. CD56<sup>bright</sup> Populationen sind grau hinterlegt. **(B)** Schwangerschaftsbezogene Veränderungen der Frequenz der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Population innerhalb der Startpopulation Lin<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> Zellen sowie der Ratio aus diesen Frequenzen. Es wurden alle Frequenzwerte der als CD56<sup>bright</sup> annotierten Metacluster addiert, woraus sich die hier angegebene Gesamtfrequenz der CD56<sup>bright</sup> Population ergab. Analog hierzu wurde die Gesamtfrequenz der CD56<sup>dim</sup> Population bestimmt, in die ebenfalls die zwei gemischt zusammengesetzten Metacluster einbezogen wurden (siehe Abbildung 15). Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die p-Werte wurden mittels der Bonferroni-Methode adjustiert (\*, p<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3). **(C)** Repräsentative Visualisierung des FlowSOM für eine Patientin im Verlauf der Schwangerschaft und postpartal. Die zu- und abnehmenden CD56<sup>bright</sup> Cluster sind grau eingefasst.



**Abbildung 15. Beurteilung der Performance des FlowSOM-Clustering.** Die verschiedenen Populationen wurden anhand ihrer Expression von CD56 und CD16 annotiert. CD56<sup>bright</sup> Populationen sind grau hinterlegt. Die Zugehörigkeit der einzelnen Cluster (einzelne Knoten) zu den 20 Metacluster ist durch den farbigen Hintergrund der Cluster-Knoten gekennzeichnet. Die Kreisdiagrammen zeigen für jedes einzelne Cluster den Anteil der manuell gegateten NK-Zell-Populationen (siehe Legend ‚Manuelles Gating‘, vgl. Abbildung 6C). Die Metacluster sind demnach überwiegend homogen entweder aus CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zusammengesetzt. Lediglich die zwei Metacluster 3 und 7 weisen eine gemischte Zusammensetzung aus CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen auf (siehe die zwei nicht annotierten Metacluster). Gezeigt sind die Ergebnisse eines Studienzeitpunkts von einer Patientin (repräsentativ für die Ergebnisse aller Patientinnen).

**Tabelle 14.** Statistik zu den Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen

	Erstes Trimester (Tri1)	Drittes Trimester (Tri3)	3 Monate postpartal (PP3)	Tri1 vs. Tri3	Tri3 vs. PP3
	Median (IQR) <sup>1</sup>	Median (IQR)	Median (IQR)	Median der Paardifferenzen (95%-KI) <sup>2</sup>	Median der Paardifferenzen (95%-KI)
				p-Wert	p-Wert
<b>(A) Angeborene lymphatische Zellen</b>					
Gesamt-NK-Zellen (%)	6,74 (5,75-11,18)	5,54 (4,65-10,92)	8,03 (6,71-16,2)	-1,2 (-3,18; 0,82)	3,34 (0,39; 6,44) <sup>a</sup>
CD127+ CD56- Zellen (%)	5 (4,32-5,55)	3,97 (2,54-5,53)	3,35 (2,13-4,77)	-1,01 (-2,16; 0,1)	-0,64 (-1,31; 0,59)
<b>(B) Manuelle Analyse – Klassische NK-Zell-Populationen</b>					
CD56dim/CD56bright (Ratio)	7,76 (5-33,7)	5,91 (3,57-12)	12,3 (8,45-21,4)	-4,41 (-14,66; -0,98)	7,04 (4,49; 11,13)
CD56bright NK-Zellen (%)	11,5 (3,47-16,7)	14,5 (8,12-22,2)	7,63 (4,49-10,7)	4,53 (1,21; 7,31)	-6,68 (-10,7; -3,77)
CD56dim NK-Zellen (%)	88,5 (83,3-96,4)	85,5 (78,1-91,9)	92,3 (89-95,5)	-4,5 (-7,25; -1,15)	6,65 (3,8; 10,75)
<b>(C) FlowSOM – Klassische NK-Zell-Populationen</b>					
CD56dim/CD56bright (Ratio)	7,06 (4,93-57,39)	5,32 (4,01-10,25)	14,49 (8,70-19,87)	-8,06 (-41,55; -0,62)	7,13 (3,96; 9,77)
CD56bright NK-Zellen (%)	12,42 (1,79-17,08)	15,88 (9-20,11)	6,49 (4,81-10,33)	5,58 (1,28; 7,4)	-7,19 (-9,75; -3,9)
CD56dim NK-Zellen (%)	87,59 (82,92-98,22)	84,12 (79,89-91)	93,52 (89,67-95,19)	-5,58 (-7,4; -1,28)	7,19 (3,9; 9,75)

Im linken Teil der Tabelle findet sich die deskriptive Statistik: Zu **(A)** ist jeweils der Median des prozentualen Anteils (%) der Gesamt-NK-Zellen an allen Doubletten-bereinigten Lymphozyten bzw. der CD127+ CD56- Zellen an den Lin- Lymphozyten je Studienzeitpunkt angegeben. Zu **(B)** und **(C)** ist jeweils der Median der Ratio CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> bzw. des prozentualen Anteils (%) der CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen an allen CD56+ NK-Zellen je Studienzeitpunkt angegeben. <sup>1</sup> Interquartilsabstand (IQR, interquartile range). Im rechten Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8) für die Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) gegen späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft gegen 3 Monate postpartal (PP3) aufgeschlüsselt. Die p-Werte in (B) und (C) wurden für multiples Testen adjustiert nach der Bonferroni-Methode. Statistisch signifikante Unterschiede bei  $\alpha=0,05$  sind fett gedruckt hervorgehoben. <sup>2</sup> 95% Konfidenzintervall (95% KI), <sup>3</sup> Effektstärke d nach Cohen, <sup>a</sup> Es sind die exakten p-Werte angegeben, da diese bei kleinen Stichproben geeigneter sind. Die angegebenen Konfidenzintervalle konnten jedoch nur mittels asymptotischer Testung ermittelt werden. Folglich weichen p-Wert und KI hinsichtlich der Signifikanz geringfügig voneinander ab.

## 4.2 Detaillierte Charakterisierung des NK-Zell-Phänotyps während und nach der Schwangerschaft bei MS

Die Aktivierung und Funktion von NK-Zellen wird durch eine Vielfalt von aktivierenden und inhibierenden Oberflächenrezeptoren reguliert (siehe Kapitel 1.1.2). Die Expression der NK-Zell-Rezeptoren gestaltet sich mit Blick auf die Einzelzelle überaus variabel, sodass daraus eine enorme Diversität von phänotypisch unterschiedlichen NK-Zell-Populationen resultiert (13). CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen des peripheren Bluts repräsentieren in dieser Komplexität prototypische NK-Zell-Phänotypen, denen spezifische Funktionen und Rollen innerhalb des Immunsystems zugeschrieben wurden (siehe Kapitel 1.1.1).

Für die Schwangerschaft, insbesondere bei Patientinnen mit MS, liegen bisher keine Informationen zum Expressionsmuster relevanter Rezeptoren auf den NK-Zellen vor. Lediglich die Proportionen der CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wurden beschrieben. Um die potentiell protektive Rolle der NK-Zellen besser entschlüsseln zu können, bedarf es jedoch eines genaueren Bildes zum NK-Zell-Phänotyp während der Schwangerschaft bei MS.

Zu diesem Zweck bildet die detaillierte Phänotypisierung der NK-Zellen im Kontext der Schwangerschaft bei MS das Kernstück der vorliegenden Arbeit. Im Folgenden werden die Ergebnisse der multiparametrischen Durchflusszytometrie zu entscheidenden NK-Zell-Molekülen dargestellt, anhand derer Rückschlüsse auf das Aktivierungspotential (aktivierende und inhibierende Rezeptoren), die Migration (Chemokinrezeptoren) und Maturation der Zellen möglich sind (siehe Details zu den einzelnen Molekülen in Tabelle 11). Die Darstellung folgt dem integrierenden Ansatz aus manueller und automatisierter Analyse. Mittels bivariaten Gating wird zuerst die Expression der einzelnen NK-Zell-Marker auf CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen betrachtet. Anschließend werden die anhand von Machine Learning-Algorithmen identifizierten NK-Zell-Populationen (überwiegend als CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Subsets) nach zwei Fragen ausgewertet: Lassen sich die Ergebnisse der manuellen Analyse bestätigen (Validierung)? Existieren bisher nicht erkannte NK-Subpopulationen, die mit der Schwangerschaft bei MS assoziiert sind (Exploration)? In Kombination der Ergebnisse aus manueller und automatisierter Analyse sollen für den Kontext der Schwangerschaft bei MS relevante Biomarker abgeleitet werden.

### 4.2.1 Schwangerschaftsbezogener Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der manuellen Analyse

Vor dem Hintergrund der berichteten Zunahme der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS, stellt sich die Frage, welche Merkmale den Phänotyp dieser Population in Bezug auf die Schwangerschaft prägen. Einen Überblick zu den schwangerschafts-bezogenen

Veränderungen des CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Phänotyps gibt Tabelle 15: Die MS-Schwangerschaft ist hiernach vorrangig mit einer Modulation aktivierender und inhibierender Rezeptoren auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen assoziiert. Die detaillierten Ergebnisse werden in den folgenden Unterabschnitten erläutert.

Die Ergebnisse zum CD56<sup>bright</sup> Phänotyp beziehen sich hierbei grundsätzlich auf die nach der manuellen Gating-Strategie definierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (siehe CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-dim</sup> in Abbildung 6A und C) von sechs MS-Patientinnen (n=6). Die Messungen von zwei Patientinnen wurden ausgeschlossen, da bei stark variabler Zellviabilität der einzelnen Proben die Markerexpression im Verlauf der Schwangerschaft nicht sicher beurteilt werden konnte (Details siehe Kapitel 3.4.3). Je nach prinzipiellen Verteilungsmuster der einzelnen Marker wurde primär entweder der prozentuale Anteil der Marker-positiven Zellen (bei bimodaler Verteilung) oder der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI bei normaler Verteilung) als Maß für die Markerexpression bestimmt (siehe Gating in Abbildung 7). Zeigte sich dabei ein statistisch signifikantes Ergebnis, wurde zusätzlich auch das jeweils andere Maß beurteilt.

**Tabelle 15.** Markerexpression auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.

	Schwangerschaft (Tri1 - Tri3 <sup>1</sup> )		Postpartal (Tri3 - PP3 <sup>2</sup> )	
	Effekt	p-Wert	Effekt	p-Wert
<b>Aktivierende Rezeptoren</b>				
CD94/NKG2C (% <sup>3</sup> )	—	0,438	—	0,875
NKp46 (MFI <sup>4</sup> )	(↑)	0,063	↓	<b>0,031</b>
DNAM (MFI)	—	0,219	—	0,563
NKG2D (MFI)	↑	<b>0,031</b>	↓	<b>0,031</b>
<b>Inhibierende Rezeptoren</b>				
CD94/NKG2A (%)	(↑)	0,063	↓	<b>0,031</b>
<b>Maturation und Migration</b>				
CD27 (%)	—	0,844	(↑)	0,094
CX3CR1 (MFI)	—	>0,9999	—	0,438
CCR7 (MFI)	↑	<b>0,031</b>	—	0,688
<b>Weitere Marker</b>				
CD94 (%)	—	>0,9999	—	0,250
CD127 (MFI)	—	>0,9999	—	0,688

Vergleiche der Gruppen <sup>1</sup>frühe Schwangerschaft (Tri1) gegen späte Schwangerschaft (Tri3) sowie <sup>2</sup>späte Schwangerschaft gegen 3 Monate postpartal (PP3) erfolgten jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6). Verglichen wurde primär entweder der <sup>3</sup>Anteil der Marker-positiven Zellen (%) an allen CD56<sup>bright</sup>

NK-Zellen (bei bimodaler Verteilung des Markers, z.B. NKG2C) oder der <sup>4</sup>geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) des Markers auf allen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (bei normaler Verteilung des entsprechenden Markers, z.B. NKp46 oder DNAM). Statistisch signifikante Unterschiede bei  $\alpha=0,05$  sind fett gedruckt hervorgehoben.

### *Schwangerschaft und postpartale Phase modulieren Expression von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren*

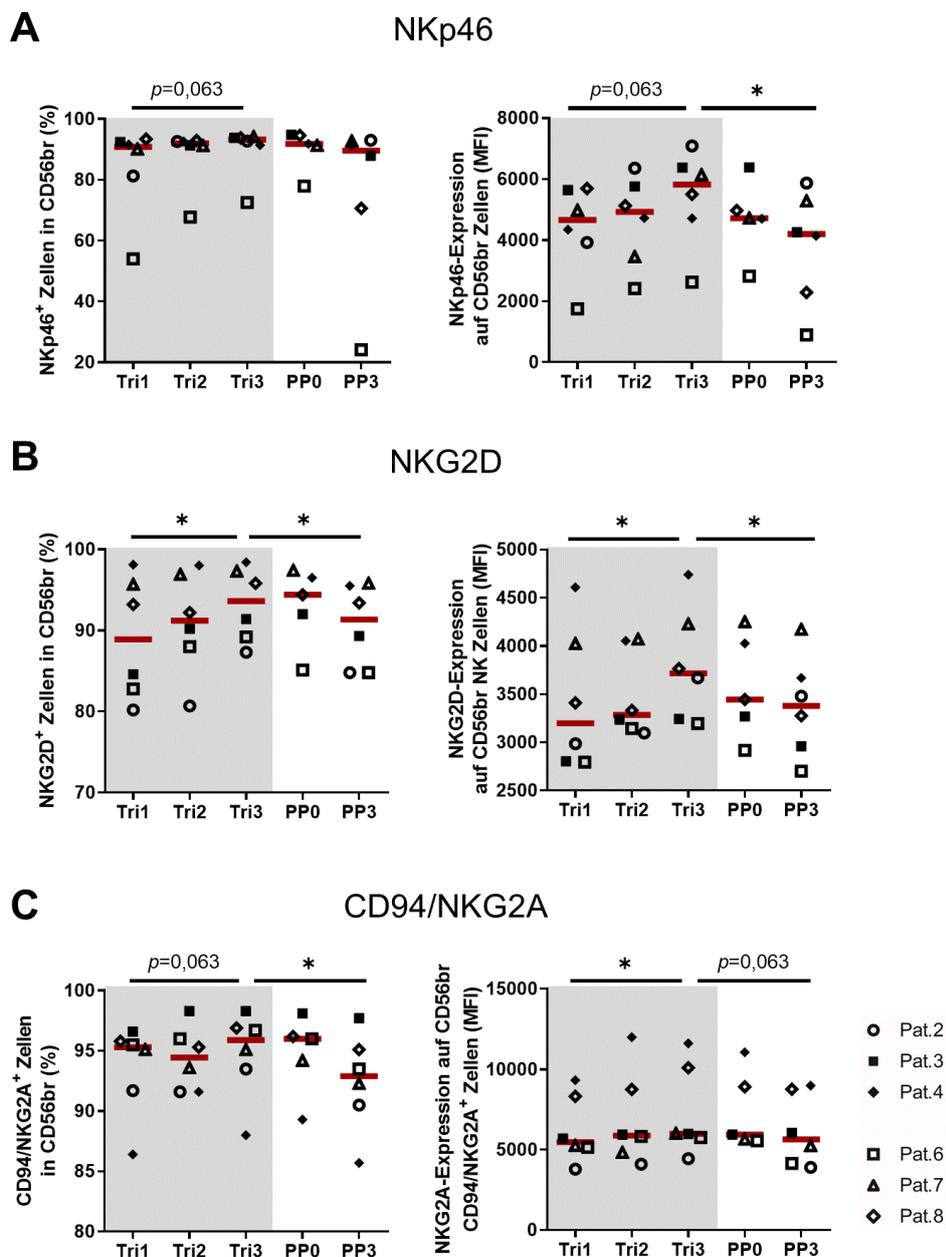
Für die aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 und NKG2D konnte eine gesteigerte Expression auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der MS-Schwangerschaft sowie ein Abfall dieser in der postpartalen Phase beobachtet werden (siehe Abbildung 16A und B). Eine detaillierte Darstellung der Statistik zu diesen und allen anderen auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen untersuchten Markern finden sich in Tabelle 16.

Der überwiegende Anteil von CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimierte NKp46 (ca. 90% [Median] zum Zeitpunkt Tri1), welches als natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor (NCR) die Aktivierung und Zytolyse gegenüber den Zielzellen induzieren kann. War zum dritten Trimenon der Schwangerschaft nur ein Trend zur Erhöhung der MFI für NKp46 und der Frequenz NKp46<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> (jeweils  $p=0,063$ ) zu erkennen, der auf ein erhöhtes NKp46-Level auf den CD56<sup>bright</sup> deutet, konnte in der anschließenden postpartalen Phase eine signifikante Reduktion der MFI für NKp46 nachgewiesen werden ( $p=0,031$ ; siehe Abbildung 16A und Tabelle 16). Für den Anteil der NKp46<sup>+</sup> Zellen wurde lediglich ein Trend zur postpartalen Reduktion beobachtet ( $p=0,094$ ).

Ein deutlicheres Bild zeigte sich für NKG2D, einem aktivierenden NK-Zell-Rezeptor, der Zellstress-Signale auf Zielzellen detektiert (siehe Abbildung 16B). CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimierten signifikant mehr NKG2D in der späten Schwangerschaft, was sich an einer gesteigerten MFI sowie einem Anstieg der NKG2D<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> um 4,2% (mediane Paardifferenz, 95% KI [0,95; 6,95],  $p=0,031$ ) ablesen ließ. Dieser Anstieg wurde gefolgt von einem signifikanten Abfall der NKG2D<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> um 2,5% innerhalb der ersten drei Monate postpartal (mediane Paardifferenz, 95% KI [-3,65; -1,8],  $p=0,031$ ), ebenfalls reflektiert durch eine postpartal erniedrigte MFI für NKG2D. Die Effektgröße für diese Veränderungen lag bei  $d=1,65$ , was innerhalb der Stichprobe von sechs MS-Patientinnen einen großen Effekt anzeigt.

Parallel zur Hochregulierung aktivierender NK-Zell-Rezeptoren in der MS-Schwangerschaft, stieg auch die Expression des inhibierenden Rezeptor-Heterodimers CD94/NKG2C auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (siehe Abbildung 16C). Für die Frequenz der CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen, die im ersten Trimester im Median 95,3% aller CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ausmachten, ließ sich nur ein Trend zum Anstieg identifizieren ( $p=0,063$ ). Betrachtet man jedoch die Expressionsdichte von NKG2A (MFI) auf den CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen, fiel eine signifikante Erhöhung auf ( $p=0,031$ ). Postpartal zeigte sich, vergleichbar mit der Entwicklung der aktivierenden Rezeptoren, eine Reduktion der NKG2A-

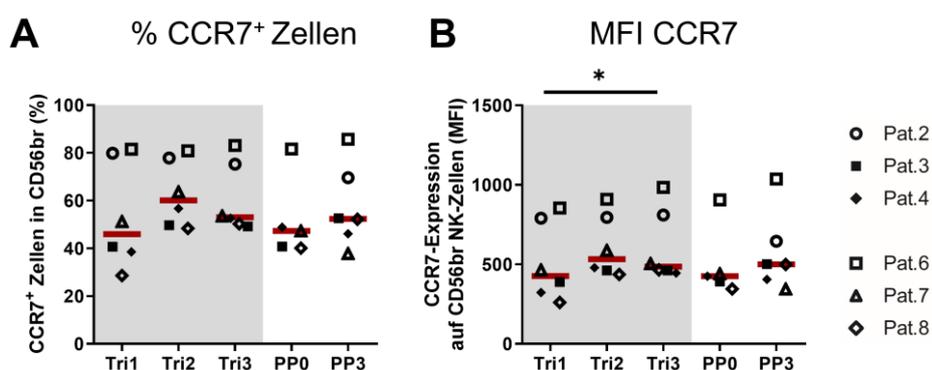
Expression, verdeutlicht durch einen signifikanten Abfall der CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen ( $p=0,031$ ) und einen Trend zur MFI-Reduktion.



**Abbildung 16. Aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.** Analysiert wurden die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Gating siehe Abbildung 6A/C und Abbildung 7A/C). Für **(A)** NKp46 und **(B)** NKG2D ist die Frequenz der Marker-positiven Zellen innerhalb aller CD56<sup>bright</sup> und die Fluoreszenzintensität (MFI) auf allen CD56<sup>bright</sup> abgebildet. **(C)** Zeigt die die Frequenz der CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56<sup>bright</sup> und die Fluoreszenzintensität von NKG2A auf CD94/NKG2A<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $n=6$ , \*,  $p$ -Wert $<0,05$ ). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).

### Gesteigerte CCR7-Expression in der späten Schwangerschaft

Der Chemokinrezeptor CCR7 vermittelt die Migration der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in die sekundären lymphatischen Gewebe (Expression überwiegend auf CD56<sup>bright</sup>, kaum auf CD56<sup>dim</sup>). In dieser Studie wurde CCR7 während des ersten Trimesters auf knapp der Hälfte der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert (Median 45,95% CCR7<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup>). Während der späten Schwangerschaft wiesen die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen eine signifikant erhöhte CCR7-Expression (MFI) auf ( $p=0,031$ ; siehe Abbildung 17B). Obwohl keine Signifikanz für die Entwicklung der Frequenz der CCR7<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> bestand, suggerierte der Schätzwert einen Anstieg von 7,85% (mediane Paardifferenz, 95% KI [-1,5; 17,9], siehe Tabelle 16). In der postpartalen Phase bestand kein Anhalt für eine Veränderung der CCR7-Expression (Frequenz und MFI) auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.



**Abbildung 17. CCR7-Expression auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.** Analysiert wurden die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (Gating siehe Abbildung 6A/C und Abbildung 7B). **(A)** zeigt die Frequenz (%) der CCR7<sup>+</sup> Zellen in allen CD56<sup>bright</sup>. In **(B)** ist die Fluoreszenzintensität (MFI) von CCR7 auf den CD56<sup>bright</sup> abgebildet. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $n=6$ , \*,  $p$ -Wert $<0,05$ ). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).

### Trend eines postpartalen Anstiegs der CD27<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen

Als Maturationsmarker, der im Verlauf der Zellreifung herunterreguliert wird, wird CD27 auf immaturren NK-Zellen exprimiert. Entsprechend findet sich CD27 v.a. auf den weniger reifen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, wie in dieser Studie auf 40,1% der CD56<sup>bright</sup> (Median zum Zeitpunkt Tri1). Für die postpartale Phase ließ sich ein Trend hin zu einem Anstieg der CD27<sup>+</sup> Zellen innerhalb aller CD56<sup>bright</sup> beobachten (mediane Paardifferenz 6,05%, 95% KI [-0,95; 10,1],  $p=0,094$ , siehe Tabelle 16).

**Tabelle 16.** Statistik zur Markerexpression der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen

	Erstes Trimester (Tri1)		Drittes Trimester (Tri3)		3 Monate postpartal (PP3)		Tri1 vs. Tri3		Tri3 vs. PP3	
	Median (IQR) <sup>1</sup>	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median der Paardifferenzen (95%-KI) <sup>2</sup>	p-Wert	Cohen's d <sup>3</sup>	Median der Paardifferenzen (95%-KI)	p-Wert	Cohen's d
<b>Aktivierende Rezeptoren</b>										
CD94/NKG2C (%)	15,5 (9,53-29,58)	18,65 (9,75-29,25)	16,65 (10,58-29,8)	0,7 (-0,25; 3,15)	0,438			-0,15 (-2; 1,9)	0,875	
NKp46 (%)	90,85 (74,48-92,65)	93,25 (86,68-93,9)	89,6 (58,98-92,78)	5,6 (0,1; 14,95) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	1,406		-11,45 (-35,8; 0,1)	0,094	1,2
NKp46 (MFI)	4663 (3379-5655)	5824 (4191-6557)	4201 (1938-5430)	805,5 (88,5; 2164,5) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	1,406		-1491,5 (-2670; -716)	<b>0,031</b>	1,646
DNAM1 (MFI)	2293 (1855-2812)	2198 (1958-2539)	2148 (1780-2584)	-101 (-292; 65)	0,219			-41 (-369; 57,5)	0,563	
NKG2D (%)	88,90 (82,15-96,30)	93,60 (88,73-97,58)	91,35 (84,80-95,58)	4,2 (0,95; 6,95)	<b>0,031</b>	1,646		-2,5 (-3,65; -1,8)	<b>0,031</b>	1,646
NKG2D (MFI)	3198 (2801-4170)	3717 (3231-4355)	3379 (2895-3795)	378,5 (167,5; 560,5)	<b>0,031</b>	1,646		-386 (-783; -121)	<b>0,031</b>	1,646
<b>Inhibierende Rezeptoren</b>										
CD94/NKG2A (%)	95,30 (90,38-96,00)	95,90 (92,13-97,25)	92,90 (89,30-95,75)	1,4 (0,55; 1,75) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	1,439		-2,4 (-3,1; -1,2)	<b>0,031</b>	1,646
CD94/NKG2A+ NKG2A (MFI)	5473 (4815-8573)	5992 (5427-10479)	5648 (4091-8823)	1031 (442; 2036)	<b>0,031</b>	1,646		-1069,5 (-2115; -229,5)	0,063 <sup>a</sup>	1,406
<b>Maturation und Migration</b>										
CD27 (%)	40,1 (35,05-50,93)	41,25 (34,00-53,40)	45,70 (40,38-60,68)	1,3 (-5,1; 7,75)	0,844			6,05 (-0,95; 10,1)	0,094	
CX3CR1 (MFI)	269 (96,78-883,5)	372,5 (144,3-753)	330,5 (136,4-772,5)	9 (-162; 103,5)	>0,9999			-28,6 (-113,5; 40,5)	0,438	
CCR7 (%)	45,95 (36,03-80,3)	53,05 (50,03- 77,25)	52,40 (44,03-73,63)	7,85 (-1,5; 17,9)	0,156			-1,95 (-11,1; 3)	0,438	
CCR7 (MFI)	426,5 (307,3-806,8)	485,0 (457,8-853,5)	500,5 (390,5-743,8)	97,5 (29,5; 168)	<b>0,031</b>	1,646		-53,5 (-162; 46,5)	0,688	
<b>Weitere Marker</b>										
CD94 (%)	99,8 (99,7-99,93)	99,8 (99,7-100)	99,7 (98,85-100)	0 (-0,1; 0,15)	>0,9999			-0,35 (-1,05; 0)	0,25	
CD127 (MFI)	512,0 (448,8-692,8)	590,5 (467-603,5)	518 (463-591,3)	0 (-102,5; 102)	>0,9999			-28,5 (-95,5; 26)	0,688	

Im linken Teil der Tabelle findet sich die deskriptive Statistik: Zu den einzelnen NK-Zell-Markern ist jeweils der Median für den Anteil der Marker-positiven Zellen (%) bzw. für die Fluoreszenzintensität (MFI) je Studienzeitpunkt angegeben. <sup>1</sup> Interquartilsabstand (IQR, interquartile range). Im rechten Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6) für die Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) gegen späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft gegen 3 Monate postpartal (PP3) aufgeschlüsselt. Statistisch signifikante Unterschiede bei  $\alpha=0,05$  sind fett gedruckt hervorgehoben. <sup>a</sup> Es sind die exakten p-Werte angegeben, da diese bei kleinen Stichproben geeigneter sind. Die angegebenen Konfidenzintervalle konnten jedoch nur mittels asymptotischer Testung ermittelt werden. Folglich weichen p-Wert und KI hinsichtlich der Signifikanz geringfügig voneinander ab. <sup>2</sup> 95% Konfidenzintervall (95% KI), <sup>3</sup> Effektstärke d nach Cohen

#### 4.2.2 Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Subsets innerhalb der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der automatisierten Analyse

Aus der manuellen Analyse zum Expressionslevel der einzelnen NK-Zell-Rezeptoren auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ergibt sich eine wichtige Orientierung zum schwangerschafts-assoziierten Phänotyp dieser Zellen. Allerdings erweist sich das traditionell bivariate Gating als grundsätzlich limitiert, wenn der vorliegende multidimensionale Datensatz nach den explorativen Gesichtspunkten der Studie ausgewertet werden soll (117). Die Methoden der *computational biology*, wie sie hier im Rahmen der FlowSOM- und Citrus-Analyse zur Anwendung kamen, eröffnen ebendiese Optionen zur automatisierten, umfassenden Exploration durchflusszytometrischer Daten. Indem alle gemessenen Zellmerkmale simultan ausgewertet werden, gruppieren ML-Algorithmen phänotypisch ähnliche Zellen in Clustern. Auf diese Weise wurden in dieser Studie NK-Zell-Subpopulationen (auch als NK-Zell-Subsets bezeichnet) mit spezifischen Markerprofilen identifiziert und visualisiert, wodurch auch der zunehmend bekanntwerdenden NK-Zell-Diversität Rechnung getragen wurde. Aus der Vielzahl der identifizierten NK-Zell-Subsets wurden diejenigen mit Relevanz für die Schwangerschaft bei MS ausgewählt und hinsichtlich ihrer Rezeptorexpression charakterisiert.

*FlowSOM: Zwei CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subsets mit einem CD16<sup>-dim</sup> NKG2C<sup>-</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp bestimmen die MS-Schwangerschaft*

Wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, wurden mittels FlowSOM alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Startpopulation) anhand der Merkmale CD56, CD16, NKG2C, NKp46, DNAM, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7, CD94 und CD127 geclustert. Die resultierenden Metacluster wurden entsprechend ihrer CD56-/CD16-Expression als CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> annotiert, wobei insgesamt sechs CD56<sup>bright</sup> Metacluster identifiziert wurden (siehe Abbildung 14A und Legende in Abbildung 15, Metacluster sind durch farbigen Hintergrund der einzelnen Cluster-Knoten gekennzeichnet). Mit ihren unterschiedlichen Markerprofilen repräsentieren die Metacluster einzelne CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subpopulationen, deren Assoziation mit der MS-Schwangerschaft nachfolgend thematisiert wird. Details zu Methodik und Workflow der FlowSOM-Analyse finden sich in Kapitel 3.4.2.

Bei einem ersten Blick auf die Visualisierung der CD56<sup>bright</sup> Metacluster im minimalen Spannbaums (MST) fiel deren Verteilung auf zwei Regionen des MST auf, wobei sich Metacluster in unmittelbarer Nachbarschaft generell am stärksten ähneln. Zwei Metacluster wiesen einen NKG2C<sup>+</sup> Phänotyp auf und fanden sich daher in der NKG2C<sup>+</sup> Region des MST getrennt von den übrigen NKG2C<sup>-</sup> Metaclustern (siehe Abbildung 8B). Die NKG2C<sup>-</sup> Metacluster exprimierten im Vergleich zu den NKG2C<sup>+</sup> Metaclustern höhere Level des inhibierenden NKG2A (Ausnahme Metacluster 19).

Um diejenigen CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subsets zu identifizieren, welche den schwangerschafts-assoziierten Immunphänotyp prägen, wurden die Metacluster auf Veränderungen ihrer Zellfrequenz im Kontext von Schwangerschaft und postpartaler Phase in der Stichprobe der acht MS-Patientinnen untersucht (n=8). Hierbei zeigten zwei Metacluster (11 und 4) eine signifikant erhöhte Zellfrequenz zur späten Schwangerschaft und einen Frequenzabfall postpartal (siehe Überblick in Tabelle 17; Details in Abbildung 18C und Tabelle 18). Abbildung 18A veranschaulicht die Lokalisation dieser beiden Metacluster im MST. Der prozentuale Anteil von Metacluster 11 an allen Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Startpopulation des Clusterings) stieg während der Schwangerschaft um 1,74% (Median der Paardifferenzen, p=0,016, d=1,48), sodass dieses Metacluster mit 3,9% aller CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Median) im dritten Trimenon das größte CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subset bildete. Postpartal fiel die Frequenz von Metacluster 11 wieder ab (mediane Paardifferenz: -1,61%; p=0,008; d=1,62). Der Anteil des Metacluster 4 erhöhte sich zum dritten Trimenon signifikant um 1,25% (mediane Paardifferenz; p=0,039; d=1,23) und verringerte sich postpartal wieder (mediane Paardifferenz: -1,39%; p=0,016; d=1,48).

Der Phänotyp dieser zwei Metacluster, die während der Schwangerschaft signifikant expandierten, wurde anschließend im Detail charakterisiert. Zur Auswertung der Markerexpression wurden (1) die Informationen in der Heatmap (Abbildung 18B), die für jedes Metacluster gemittelte Expressionslevel zu den einzelnen Markern angibt, und (2) die Markerspezifischen MSTs (Abbildung 8B), welche die medianen Fluoreszenzwerte für jedes einzelne Cluster (repräsentiert durch die einzelnen Knoten des MSTs) farbcodieren, herangezogen. Eine Übersicht zum Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> Metacluster findet sich in Tabelle 17. Als gemeinsames Expressionsmuster der beiden expandierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subsets (Metacluster 11 und 4) bildete sich ein NKG2C<sup>-</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp ab, wobei die Rezeptoren NKp46 und NKG2A im Vergleich zu den meisten anderen CD56<sup>bright</sup> Subsets auf Metacluster 11 und 4 entsprechend stärker exprimiert wurden. So weist neben der manuellen Analyse auch das FlowSOM-Clustering auf eine mögliche Relevanz dieser Moleküle für die MS-Schwangerschaft. Der aktivierende Rezeptor NKG2D wurde auf Metacluster 11 hochpositiv exprimiert; Metacluster 4 zeigte eine niedrigere NKG2D-Expression. CCR7 wurde auf den einzelnen Clustern innerhalb der beiden Metacluster unterschiedlich exprimiert, sodass im Mittel eher eine niedrige CCR7-Expression resultierte. Beide CD56<sup>bright</sup> Metacluster enthielten zudem neben CD16<sup>-</sup> Zellen auch einen wesentlichen Anteil an CD16<sup>dim</sup> Zellen, der nur in Metacluster 12 höher war. Nahezu alle durch FlowSOM identifizierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subsets zeigten einen CD94<sup>high</sup> Phänotyp, allerdings verfügten Metacluster 11 und 4 über die jeweils höchste Expression dieses mit NKG2A coexprimierten Rezeptors. Metacluster 11 exprimiert überdies im Unterschied zu Metacluster 4 CD27 und CD127 schwachpositiv.

Neben den beiden NKG2C<sup>-</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Subsets fiel zusätzlich Metacluster 18 durch einen nicht-signifikanten Trend zur Erhöhung der Zellfrequenz im dritten Trimester (p=0,055; siehe Tabelle 18) und einen signifikanten Frequenzabfall postpartal (p=0,008) auf. Geprägt war dieses Subset von einem CD16<sup>-</sup> NKG2C<sup>-</sup> NKG2A<sup>high</sup> CCR7<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup> Phänotyp.

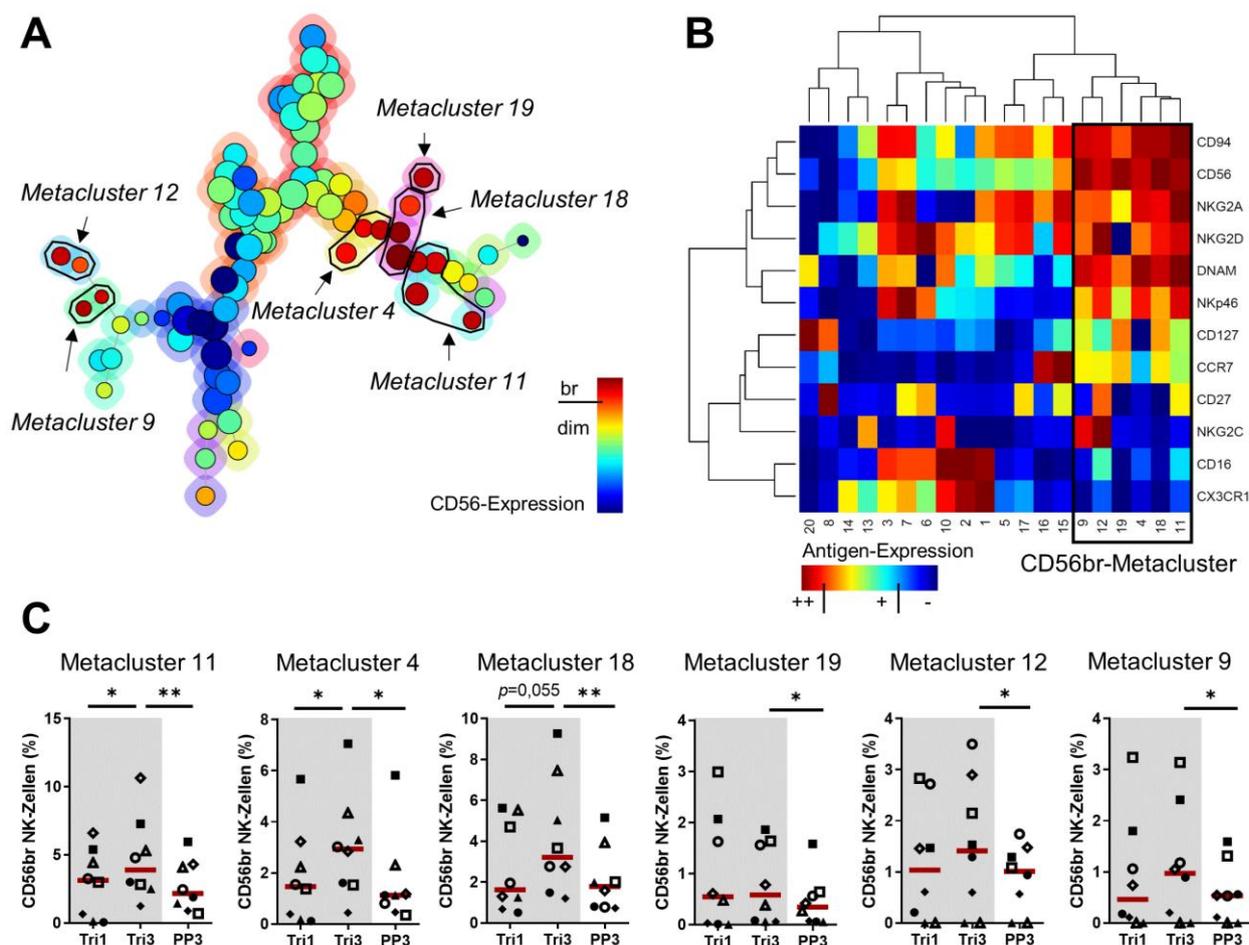
Zum Abschluss der Beurteilung der FlowSOM-Ergebnisse soll ein weiterer genereller Aspekt benannt werden. Die signifikante Reduktion Zellfrequenz postpartum, die bereits für Metacluster 11, 4 und 18 beschrieben wurde, zeigte sich ebenfalls bei allen anderen CD56<sup>bright</sup> Metacluster (siehe Tabelle 17, Tabelle 18). Diese Beobachtung scheint die generelle Reduktion der CD56<sup>bright</sup> postpartal auszudrücken, die alle CD56<sup>bright</sup> Subsets gleichermaßen betrifft. Umgekehrt scheint die CD56<sup>bright</sup> Expansion während der Schwangerschaft von den hier charakterisierten Subsets dominiert zu sein.

**Tabelle 17.** Zellfrequenz und Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> FlowSOM-Metacluster

Meta-cluster	CD16- Expression	Merkmale des Metaclusters	Tri1 – Tri3	Tri3 – PP3
<b>Metacluster mit signifikanter Veränderung der Zellfrequenz prä- und postpartal</b>				
11	CD16-/dim	NKG2C- NKp46++ DNAM++ NKG2D++ NKG2A++ CD27+ CX3CR1- CCR7+ CD94++ CD127±	↑	↓
4	CD16-/dim	NKG2C- NKp46++ DNAM++ NKG2D+ NKG2A++ CD27- CX3CR1- CCR7± CD94++ CD127-	↑	↓
<b>Metacluster mit signifikanter Veränderung der Zellfrequenz postpartal</b>				
18	CD16-	NKG2C- NKp46± DNAM++ NKG2D+ NKG2A++ CD27- CX3CR1- CCR7+ CD94++ CD127+	(↑) <sup>1</sup>	↓
19	CD16-	NKG2C- NKp46+ DNAM+ NKG2D- NKG2A+ CD27- CX3CR1- CCR7+ CD94+ CD127+	—	↓
12	CD16dim	NKG2C++ NKp46++ DNAM++ NKG2D++ NKG2A+ CD27+ CX3CR1- CCR7± CD94++ CD127+	—	↓
9	CD16-	NKG2C++ NKp46+ DNAM++ NKG2D+ NKG2A+ CD27- CX3CR1- CCR7+ CD94++ CD127+	—	↓

Angegeben ist die Veränderung der Zellfrequenz der FlowSOM-Metacluster innerhalb der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen: ↑, Anstieg; ↓, Reduktion; —, keine Veränderung. Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) vs. späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft vs. 3 Monate postpartal (PP3) erfolgten jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die zwei mittleren Spalten zeigen die Markerprofile der Metacluster. Expressionslevels: (-) keine Expression, (±) Expression nur auf einzelnen

Clustern, (+) schwachpositiv exprimiert (dim), (++) hochpositiv exprimiert (br); <sup>1</sup> (↑) zeigt einen nicht signifikanten Trend mit  $p=0,055$ .



**Abbildung 18. CD56<sup>bright</sup> Metacluster während und nach der Schwangerschaft bei MS.** Mittels FlowSOM wurden alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Startpopulation) anhand der Merkmale CD56, CD16, NKG2C, Nkp46, DNAM, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7, CD94 und CD127 geclustert (Details zum Workflow siehe Kapitel 3.4.2). Die Zugehörigkeit der einzelnen Cluster zu den 20 Metacluster ist durch den farbigen Hintergrund der Cluster-Knoten gekennzeichnet. **(A)** Lokalisation der CD56<sup>bright</sup> Metacluster in zwei verschiedenen Regionen des MST: Metacluster 9 und 12 in der NKG2C<sup>+</sup> Region, restliche Metacluster in der NKG2C<sup>-</sup> Region (vergleiche NKG2C-Expression in Abbildung 8). **(B)** Heatmap zur Markerexpression der FlowSOM-Metacluster. Die Zeilen stehen jeweils für ein NK-Zell-Molekül, Spalten repräsentieren die Metacluster. CD56<sup>bright</sup> Metacluster sind eingerahmt. Felder zeigen den Median der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Antigens. Expressionslevel: (-) keine Expression; (+) schwachpositiv exprimiert (dim); (++) hochpositiv exprimiert (br). **(C)** Schwangerschaftsbezogene Veränderungen der Frequenz der CD56<sup>bright</sup> Metacluster. Die Frequenzen zeigen den Anteil der im jeweiligen Metacluster enthaltenen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen an der Startpopulation der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Zellen. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die p-Werte wurden nicht adjustiert (Signifikanzniveaus \*,  $p<0,05$ ; \*\*,  $p<0,01$ ). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).

Tabelle 18. Statistik zur Zellfrequenz der FlowSOM-Metacluster

	Erstes Trimester (Tri1)		Drittes Trimester (Tri3)		3 Monate postpartal (PP3)		Tri1 vs. Tri3		Tri3 vs. PP3		
	Median (IQR) <sup>1</sup>	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median der Paardifferenzen (95%-KI) <sup>2</sup>	p-Wert	Cohen's d <sup>3</sup>	Median der Paardifferenzen (95%-KI)	p-Wert	Cohen's d
<b>CD56<sup>bright</sup></b>											
Metacluster 11	3,13 (0,26-5,15)	3,9 (2,59-6,79)	2,18 (1,03-4,26)	1,74 (0,69; 2,95)	1,481	-1,61 (-3,78; -0,84)	<b>0,016</b>	1,481	-1,61 (-3,78; -0,84)	<b>0,008</b>	1,624
Metacluster 4	1,47 (0,23-2,98)	2,94 (1,55-4,09)	1,13 (0,55-2,03)	1,25 (0,1; 2,26)	1,234	-1,39 (-2,11; -0,61)	<b>0,039</b>	1,234	-1,39 (-2,11; -0,61)	<b>0,016</b>	1,481
Metacluster 18	1,63 (0,82-5,32)	3,22 (1,81-6,85)	1,79 (0,79-3,46)	1,38 (0,21; 2,79) <sup>a</sup>	1,124	-2,05 (-3,28; -0,93)	0,055 <sup>a</sup>	1,124	-2,05 (-3,28; -0,93)	<b>0,008</b>	1,624
Metacluster 19	0,55 (0,02-1,96)	0,58 (0,07-1,62)	0,35 (0,06-0,62)	-0,03 (-0,66; 0,07)	0,484	-0,26 (-0,68; -0,02)	0,484	0,484	-0,26 (-0,68; -0,02)	<b>0,023</b>	1,42
Metacluster 12	1,04 (0,05-2,41)	1,41 (0,15-2,71)	1,01 (0,14-1,43)	0,38 (-0,31; 0,93)	0,219	-0,6 (-1,25; -0,02)	0,219	0,219	-0,6 (-1,25; -0,02)	<b>0,031</b>	1,318
Metacluster 9	0,46 (0,03-1,62)	0,97 (0,05-2,1)	0,54 (0,03-1,12)	0,18 (0; 0,46) <sup>a</sup>	0,094 <sup>a</sup>	-0,42 (-1,08; -0,04)	0,094 <sup>a</sup>	0,094 <sup>a</sup>	-0,42 (-1,08; -0,04)	<b>0,031</b>	1,318
<b>CD56<sup>dim</sup></b>											
Metacluster 6	0,73 (0,25-1,04)	0,71 (0,45-1,14)	0,48 (0,27-0,88)	0,16 (0; 0,59) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	-0,17 (-0,64; -0,04)	0,063 <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	-0,17 (-0,64; -0,04)	<b>0,023</b>	1,352
Metacluster 20	0,54 (0,29-0,86)	0,36 (0,21-0,59)	0,42 (0,16-0,61)	-0,10 (-0,3; -0,03)	<b>0,016</b>	0,03 (-0,04; 0,11)	<b>0,016</b>	1,418	0,03 (-0,04; 0,11)	0,547	
<b>Gemischt</b>											
Metacluster 7	0,84 (0,17-1,52)	1,41 (1,03-2,4)	0,92 (0,37-1,89)	0,83 (0,46; 2,51)	<b>0,008</b>	-0,62 (-3,98; -0,39)	<b>0,008</b>	1,624	-0,62 (-3,98; -0,39)	<b>0,008</b>	1,624
Metacluster 3	2,4 (0,37-8,33)	5,16 (3,43-9,68)	2,07 (1,46-4,5)	2,21 (-0,23; 3,93)	0,078	-3,45 (-5,74; -1,67)	0,078	0,078	-3,45 (-5,74; -1,67)	<b>0,008</b>	1,624

Im linken Teil der Tabelle findet sich die deskriptive Statistik: Zu den einzelnen FlowSOM-Metaclustern ist der Median ihrer Zellfrequenz (%) innerhalb der Startpopulation Lin<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen zum jeweiligen Studienzeitpunkt angegeben. <sup>1</sup> Interquartilsabstand (IQR, interquartile range). Im rechten Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8) für die Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) gegen späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft gegen 3 Monate postpartal (PP3) aufgeschlüsselt. Statistisch signifikante Unterschiede bei  $\alpha=0,05$  sind fett gedruckt hervorgehoben. <sup>2</sup> 95% Konfidenzintervall (95% KI), <sup>3</sup> Effektstärke d nach Cohen, <sup>a</sup> Es sind die exakten p-Werte angegeben, da diese bei kleinen Stichproben geeigneter sind. Die angegebenen Konfidenzintervalle konnten jedoch nur mittels asymptotischer Testung ermittelt werden. Folglich weichen p-Wert und KI hinsichtlich der Signifikanz geringfügig voneinander ab.

*Citrus: Assoziation zwischen Schwangerschaft bei MS und CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit einem CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp*

Der explorativen Zielsetzung der NK-Zell-Studie folgend kam ein weiterer Machine Learning (ML)-Algorithmus zur Anwendung. Citrus kombiniert ein initiales Clustering der Zellen mit supervidierten ML-Modellen, welche diejenigen Cluster auswählen, die mit einer der getesteten Konditionen (in dieser Studie mit der Schwangerschaft) assoziiert sind. Dieser Prozess wird auch als Biomarker-Identifikation bezeichnet. Hierzu werden die Merkmale der identifizierten Cluster, wie Zellfrequenz oder mediane Markerexpression, auf signifikante Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen, die vorher entsprechend der Konditionen (im Fall dieser Studie: frühe und späte Schwangerschaft sowie postpartum) festgelegt wurden, untersucht. Vorteil von Citrus ist, dass auf diese Weise relevante Biomarker in einem voll-automatisierten Prozess identifiziert werden können. Weitere Details zu Methodik und Workflow der Citrus-Analyse finden sich in Kapitel 3.4.2.

Die Citrus-Ergebnisse zu den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen basieren auf folgenden Analyse-Bedingungen: Als Startpopulation für die Analyse wurden nur CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ausgewählt. Diese wurden im Vorfeld durch manuelles Gating definiert. Den drei experimentellen Gruppen ‚erstes Trimester‘ (Tri1), ‚drittes Trimester‘ (Tri3) und ‚drei Monate postpartal‘ (PP3) wurden jeweils die entsprechenden Proben der acht MS-Patientinnen zugeordnet (n=8 für Tri3 und PP3), lediglich in der Gruppe Tri1 konnte eine Probe aufgrund einer zu geringen Zellzahl nicht benutzt werden (n=7 Tri1). Das Clustering wurde anhand der NK-Zell-Merkmale CD16, NKG2C, NKp46, DNAM, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7 und CD127 durchgeführt. Es kam das korrelative Modell SAM (Significance Analysis of Microarrays) zum Einsatz, welches alle Cluster identifizierte, die mit einer der experimentellen Gruppen korrelierten. Die Cluster wurden dabei auf Unterschiede ihrer Zellfrequenz (hier auch als Abundance bzw. Häufigkeit bezeichnet) zwischen den experimentellen Gruppen untersucht. Weil das Funktionsprinzip von Citrus zu einem entscheidenden Teil auf Zufälligkeit basiert, musste das Ergebnis durch mehrmalige Wiederholung des erfolgreichen Citrus-Durchlaufs bei exakt gleichen Einstellungen validiert werden.

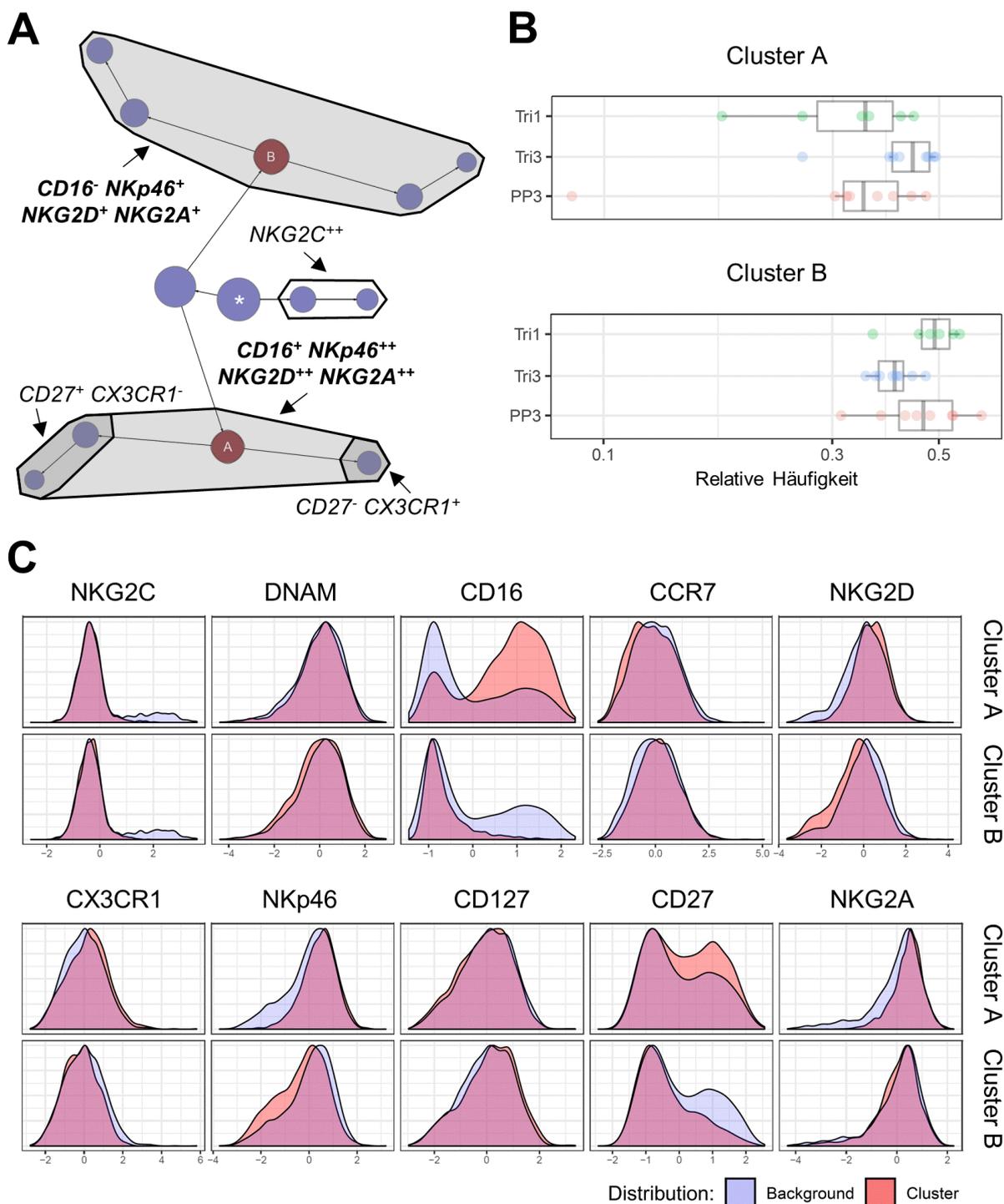
Innerhalb der baumartigen Visualisierung der Citrus-Ergebnisse ließen sich drei Hauptcluster ausmachen: ein NKG2C<sup>+</sup> Cluster mit dem niedrigsten prozentualen Anteil an der Gesamtpopulation der analysierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und die zwei NKG2C<sup>-</sup> Cluster A und B (siehe Abbildung 19A). In der Beurteilung und Annotation der Cluster war es entscheidend, die prinzipiell hierarchische und redundante Struktur des Citrus-Baums zu beachten. Ausgehend von einem zentralen Cluster (in Abbildung 19A mit (\*) gekennzeichnet), welches alle Zellen der Analyse enthält, trennen dichotome Aufzweigungen die übergeordneten Cluster anhand von Merkmalsunterschieden der Zellen in immer kleinere Cluster auf. Dabei enthält ein Cluster vor

einer Aufzweigung alle Zellen der untergeordneten Cluster. Beispielweise enthielt Cluster A alle Zellen aus den beiden untergeordneten, mit CD27<sup>-</sup> CX3CR1<sup>+</sup> bzw. CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>-</sup> annotierten Clustern und das Cluster CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>-</sup> verfügte über ein weiteres Untercluster.

Als Cluster mit stratifizierendem Verhalten identifizierte der Citrus-Algorithmus Cluster A und B, d.h. beide Cluster wiesen signifikante Unterschiede ihrer Zellfrequenz zwischen den untersuchten Gruppen auf (siehe Abbildung 19B). So stieg die Häufigkeit von Cluster A innerhalb aller analysierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zur späten Schwangerschaft (Tri3) an und fiel in den ersten drei Monaten postpartal (PP3) wieder ab. Cluster B zeigte ein inverses Muster mit einer Reduktion seines Anteils an den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im dritten Trimester und einer postpartalen Expansion.

Die Charakterisierung des Phänotyps von Cluster A und B erfolgte anschließend (1) anhand der Histogramme, welche die Markerexpression der Zellen von Cluster A und B im Vergleich zu allen anderen Zellen der Analyse (Background) darstellen (siehe Abbildung 19C), und (2) mittels der Marker-spezifischen Citrus-Bäume, die für jedes Cluster des Citrus-Baums separat aufschlüsseln, wie stark die einzelnen Marker exprimiert werden (siehe Abbildung 9). Hiernach wies Cluster A – als dominierendes CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Subset in der späten Schwangerschaft – einen CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp auf, dessen Fluoreszenzintensität für NKp46, NKG2D und NKG2A im Vergleich zu den anderen Clustern entsprechend höher lag. Generell exprimieren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen entweder kein oder nur geringe Level des Fcγ-Rezeptor-IIIa CD16. Ein Großteil der Zellen in Cluster A erwies sich als CD16<sup>+</sup>, sodass Cluster A das CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> Subset innerhalb des Citrus-Baums repräsentierte. Eine dichotome Aufzweigung trennte Cluster A in zwei untergeordnete Cluster, welche den unterschiedlichen Maturationsstatus der Zellen in Cluster A widerspiegelte: das eine Cluster enthielt relativ reife CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit einem CD27<sup>-</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Phänotyp und der höchste CD16-Expression innerhalb von Cluster A, während das andere Cluster immature CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>-</sup> Zellen mit geringerer CD16-Expression, jedoch hoher CCR7-Expression umfasste. CCR7, außerdem auf einem Teil der Zellen von Cluster B und dem NKG2C<sup>+</sup> Cluster exprimiert, erreichte auf den CD27<sup>+</sup> Zellen von Cluster A die höchste Expressionsdichte.

Postpartal kehrte sich das Verhältnis zwischen der Frequenz von Cluster A und B innerhalb der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen um, sodass das CD16<sup>-</sup> Cluster B das vorrangige CD56<sup>bright</sup> Subset in der postpartalen Phase bildete. Die Zellen des Cluster B zeigten eine deutlich geringere Expression der NK-Zell-Rezeptoren NKp46, NKG2D und NKG2A und waren CD27<sup>-</sup>. Einzelne Untercluster exprimierten CD127, CCR7 sowie teils hohe DNAM-Level.



**Abbildung 19. CD56<sup>bright</sup> Citrus-Cluster während und nach der Schwangerschaft bei MS.** Die Citrus-Analyse umfasste das automatisierte Clustern der Startpopulation CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen anhand der in (C) aufgeführten NK-Zell-Moleküle und die anschließende Bestimmung von Clustern, deren Zellfrequenz (Häufigkeit) zwischen den experimentellen Gruppen Tri1, Tri3 und PP3 signifikant variierte (bei einer false discovery rate (FDR) von 1%). Hierzu wurde das korrelative Assoziationsmodell SAM verwendet. Weitere Bedingungen des Citrus-Laufs: Sampling der gleichen Zellzahl von 409 Zellen der Startpopulation CD56<sup>bright</sup> pro Probe; minimale Clustergröße 10. **(A)** Hierarchische Organisation der CD56<sup>bright</sup> Cluster Citrus-Baum. Die Baumstruktur ist hierarchisch und redundant organisiert, d.h. ein Cluster enthält jeweils alle Zellen der Cluster, die nach seiner dichotomen Auftrennung folgen. **(B)** Stratifizierende Cluster A und B (rot gefärbt in (A)) zeigen signifikante Unterschiede ihrer Zellfrequenz (Häufigkeit) zwischen den

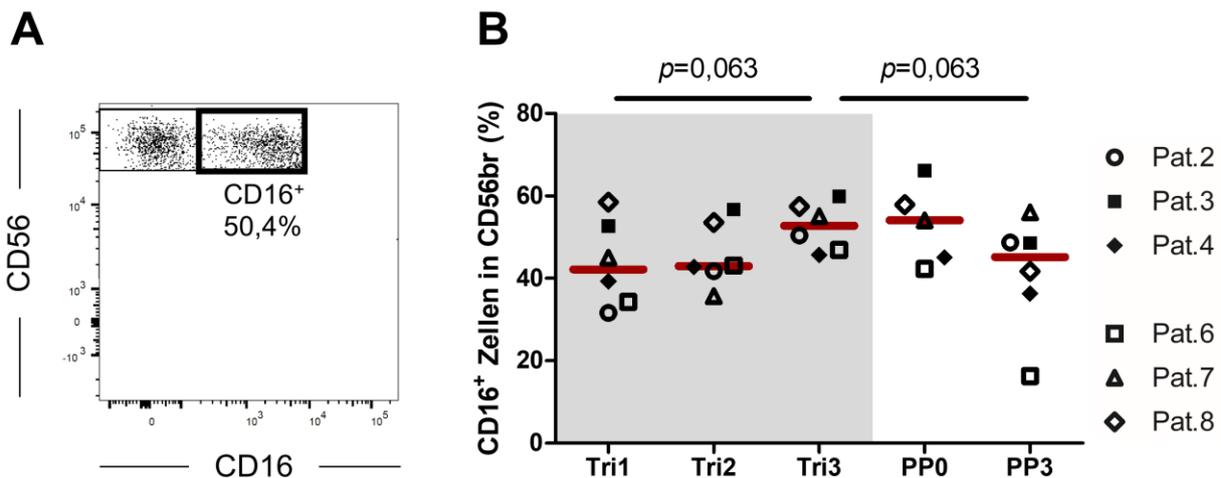
Gruppen. Dargestellt ist die Häufigkeit der Zellen des Clusters bezogen auf alle analysierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen pro Probe auf einer dekadisch-logarithmischen Skala. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3). **(C)** Expression der einzelnen NK-Zell-Moleküle auf Cluster A und B. Histogramme zeigen in Rot die Expression der Clusterzellen, in Blau die Expression aller Zellen, die nicht zu dem jeweiligen Cluster gehören.

Zur Validierung der Ergebnisse wurde der initiale Citrus-Lauf unter gleichen Bedingungen weitere vier Male wiederholt (insgesamt fünf identische Citrus-Durchläufe). Aufgrund der stochastischen Natur des Clusterings ergaben sich unterschiedlich aufgebaute Citrus-Bäume, in denen anhand des Markerprofils zu Cluster A/B äquivalente Cluster identifiziert und auf signifikante Veränderungen überprüft wurden. Eine Korrelation zwischen der Zunahme von Clustern mit CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp (Cluster A entsprechend) und der späten Schwangerschaft fand sich in 3 von 5 Durchläufen. Ein Cluster analog zum Phänotyp von Cluster B fiel nur in einem weiteren Durchlauf (insgesamt 2/5) durch einen signifikante Frequenzanstieg postpartum auf.

#### *Bestätigung der Ergebnisse zum CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> Phänotyp mittels manueller Analyse*

Sowohl die Ergebnisse des FlowSOM- als auch des Citrus-Algorithmus deuteten auf CD16 als eines der Moleküle, die den Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der MS-Schwangerschaft bestimmen. Der Fcγ-Rezeptor-IIIa CD16 vermittelt durch Bindung von Antikörper, die an Zielzellen gebunden sind, die antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) der NK-Zellen. Zwar wurde CD16 gemeinsam mit CD56 als Marker zur Definition der klassischen NK-Zell-Populationen herangezogen – hiernach wurden CD56<sup>bright</sup> (CD16<sup>-/+</sup>) sowie CD56<sup>dim</sup> (CD16<sup>bright</sup>) als Populationen für die nachfolgende manuelle Analyse der Markerexpression ausgewählt – eine Quantifizierung der CD16-Expression auf den CD56<sup>bright</sup> erfolgte jedoch nicht. Anschließend an die automatisierte Analyse wurden die neuen Ergebnisse zu CD16 daher durch manuelles Gating überprüft.

Analog zum Vorgehen der manuellen Analyse der anderen Marker auf CD56<sup>bright</sup> wurden alle CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (sowohl CD16<sup>-</sup> als auch CD16<sup>+</sup>) ausgewählt und der prozentuale Anteil der CD16<sup>+</sup> an den CD56<sup>bright</sup> bestimmt (in n=6, siehe Abbildung 20). Für die Schwangerschaft wurde ein Trend hin zu einer Erhöhung der Frequenz der CD16<sup>+</sup> Zellen von 42,15% im ersten Trimester auf 52,75% im dritten Trimester (Mediane) beobachtet (p=0,063). Postpartal zeigte sich ein Trend zu einem Abfall des Anteils der CD16<sup>+</sup> Zellen auf 45,15% (Median) innerhalb der ersten drei Monate nach Geburt (p=0,063).



**Abbildung 20. Frequenz der CD16<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. (A)** Gating der CD16<sup>+</sup> Zellen (repräsentativer Plot). Der abgebildete Plot zeigt alle CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die nach der Gating-Strategie in Abbildung 6A/C ausgewählt wurden. Um die Frequenz der CD16<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zu bestimmen, wurde das fett gerahmte Gate gesetzt. **(B)** Frequenz der CD16<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6; \*,  $p$ -Wert<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3, 6, 9 und 12 Monate nach Entbindung (PP3-12).

#### 4.2.3 Schwangerschaftsbezogener Phänotyp der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der manuellen Analyse

CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen werden in der Regel als reife Effektor-NK-Zellen mit ausgeprägter Zytotoxizität beschrieben. In dieser Studie konnte für die späte Schwangerschaft eine Reduktion der CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Frequenz beobachtet werden. In den ersten drei Monaten nach Geburt stieg der Anteil der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen jedoch wieder deutlich an. Welche NK-Zell-Moleküle den Phänotyp der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in Schwangerschaft und postpartaler Phase bestimmen, soll in diesem Abschnitt besprochen werden. Tabelle 19 enthält hierzu einen Überblick. Die Ergebnisse beziehen sich hierbei grundsätzlich auf die nach der manuellen Gating-Strategie definierten CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (siehe CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> in Abbildung 6 A und C) von sechs MS-Patientinnen (n=6). Initial wurde je nach Verteilungsmuster der einzelnen Marker entweder der prozentuale Anteil der Marker-positiven Zellen oder der geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) untersucht. Ausführliche Informationen zur deskriptiven Statistik und zu den Ergebnissen der Wilcoxon-Tests finden sich in Tabelle 20.

**Tabelle 19.** Markerexpression auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.

	Schwangerschaft (Tri1 - Tri3 <sup>1</sup> )		Postpartal (Tri3 - PP3 <sup>2</sup> )	
	Effekt	p-Wert	Effekt	p-Wert
<b>Aktivierende Rezeptoren</b>				
CD94/NKG2C (% <sup>3</sup> )	—	0,313	—	0,438
NKp46 (MFI <sup>4</sup> )	(↑)	0,063	↓	<b>0,031</b>
DNAM (MFI)	—	0,438	—	0,094
NKG2D (MFI)	—	0,219	(↓)	0,063
<b>Inhibierende Rezeptoren</b>				
CD94/NKG2A (%)	—	0,563	↓	<b>0,031</b>
<b>Maturation und Migration</b>				
CD27 (%)	↑	<b>0,031</b>	↓	<b>0,031</b>
CX3CR1 (MFI)	—	0,563	↓	<b>0,031</b>
CCR7 (MFI)	—	0,528	—	1,000
<b>Weitere Marker</b>				
CD94 (%)	—	1,000	(↓)	0,063
CD127 (MFI)	↑	<b>0,031</b>	↓	<b>0,031</b>

Vergleiche der Gruppen <sup>1</sup>frühe Schwangerschaft (Tri1) gegen späte Schwangerschaft (Tri3) sowie <sup>2</sup>späte Schwangerschaft gegen 3 Monate postpartal (PP3) erfolgten jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6). Verglichen wurde primär entweder der <sup>3</sup>Anteil der Marker-positiven Zellen (%) an allen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (bei bimodaler Verteilung des Markers, z.B. NKG2C) oder der <sup>4</sup>geometrische Mittelwert der Fluoreszenzintensität (MFI) des Markers auf allen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (bei normaler Verteilung des entsprechenden Markers, z.B. NKp46 oder DNAM). Statistisch signifikante Unterschiede bei  $\alpha=0,05$  sind fett gedruckt hervorgehoben.

*Veränderte Expression des aktivierenden NKp46 und des inhibierenden NKG2A zeigt sich auch auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in Bezug auf die Schwangerschaft*

Im Vergleich zu den CD56<sup>bright</sup> exprimiert generell ein geringerer Anteil der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen den natürlichen Zytotoxizitätsrezeptor (NCR) NKp46; in dieser Studie lag die Frequenz der NKp46<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zum ersten Trimester bei 64,0% (Median). Die NKp46-Expression stellte sich dabei nicht als bimodal, sondern als Kontinuum von negativer, dim- bis bright-Expression dar (siehe Abbildung 7A). Vergleichbar mit den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen veränderte sich auch die NKp46-Expression auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (siehe Abbildung 21A und Tabelle 20). Im dritten Trimester der Schwangerschaft zeigte sich sowohl ein Trend hin zu einer erhöhten MFI als auch zu einem höheren Anteil NKp46<sup>+</sup> Zellen (p=0,063). Postpartal fiel die NKp46-Expression der CD56<sup>dim</sup> erheblich, angezeigt durch eine jeweils deutliche und signifikante Reduktion der MFI und der NKp46<sup>+</sup> Zellen (mediane Paardifferenz für Letztere: -20,65%; p=0,031, d=1,65).

Der Anteil der CD56<sup>dim</sup> Zellen, die das inhibierende Rezeptorheterodimer CD94/NKG2A exprimierten, machte ebenfalls ca. 60% im ersten Trimenon aus. Obwohl sich dieser Anteil zur späten Schwangerschaft nicht veränderte, konnte ein signifikanter Anstieg der MFI für NKG2A auf den CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden, gefolgt von einem MFI-Abfall postpartal (jeweils mit  $p=0,031$  und  $d=1,65$ ; siehe Abbildung 21B und Tabelle 20). In den ersten drei Monaten nach Geburt sank außerdem die Frequenz der CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen um 9,95% (mediane Paardifferenz; 95% KI [-13,5; -7,9];  $p=0,031$ ,  $d=1,65$ ) sowie damit verbunden die Frequenz der CD94<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (Trend,  $p=0,063$ ).

#### *Erhöhung des Anteils CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen während der MS-Schwangerschaft gefolgt von einer postpartalen Reduktion*

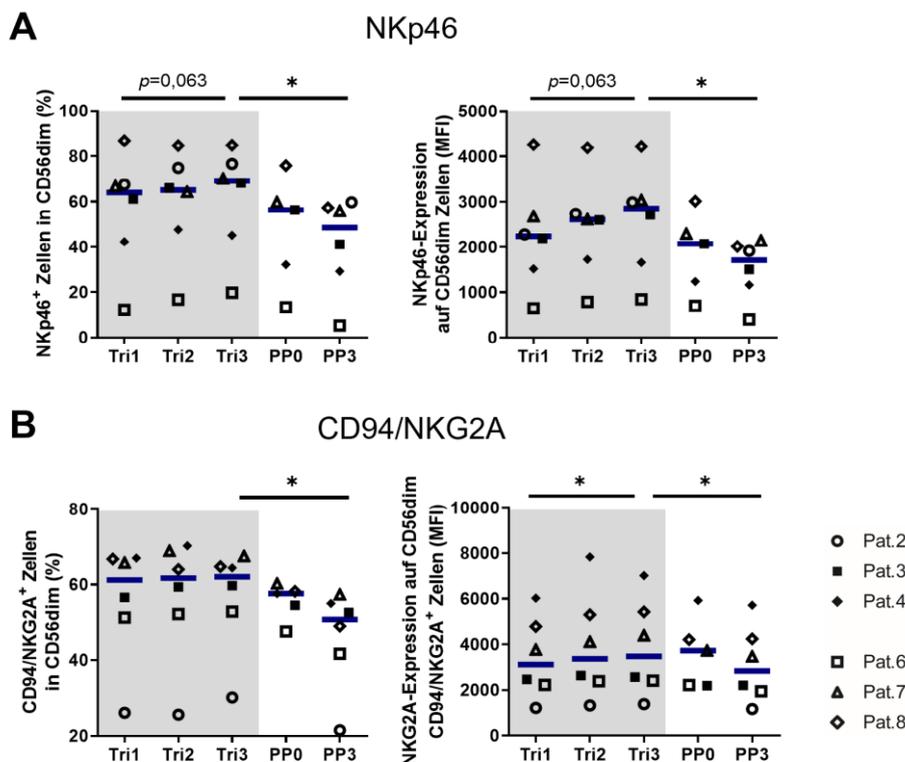
Nach dem linearen Modell der NK-Zell-Entwicklung stellen die CD56<sup>dim</sup> Zellen terminal differenzierte, reife NK-Zellen dar. Entsprechend exprimieren CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen hohe Level des auf reifen Zellen vorkommenden Chemokinrezeptors CX3CR1. So zeigten sich zur Baseline im ersten Trimester 94,6% der CD56<sup>dim</sup> Zellen CX3CR1<sup>+</sup> (Median). Während der Schwangerschaft bestand kein Hinweis für eine Veränderung der CX3CR1-Expression (sowohl im Anteil der CX3CR1<sup>+</sup> Zellen wie auch für die MFI). Postpartal fiel die MFI für CX3CR1 signifikant ab ( $p=0,031$ ,  $d=1,65$ ); die Frequenz der CX3CR1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen blieb jedoch unverändert (siehe Abbildung 22A und Tabelle 20).

Der Maturationsmarker CD27 wird wie bereits beschrieben auf immaturren NK-Zellen und damit vorrangig auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimiert. Ein kleines Subset von CD27<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> existiert dennoch; in dieser Studie machte es 4,14% aller CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen aus, wobei der überwiegende Teil dieser Zellen gleichzeitig CX3CR1 exprimiert und somit einen intermediären Phänotyp zwischen terminal differenzierten und immaturren NK-Zellen repräsentierte. Zur späten Schwangerschaft stieg der Anteil der CD27<sup>+</sup> Zellen, genauer der Anteil der CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Zellen (nicht der CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>-</sup>), an (jeweils  $p=0,031$ ), um sich in der postpartalen Phasen wieder zu reduzieren (siehe Abbildung 22 B/C und ausführliche Statistik in Tabelle 20).

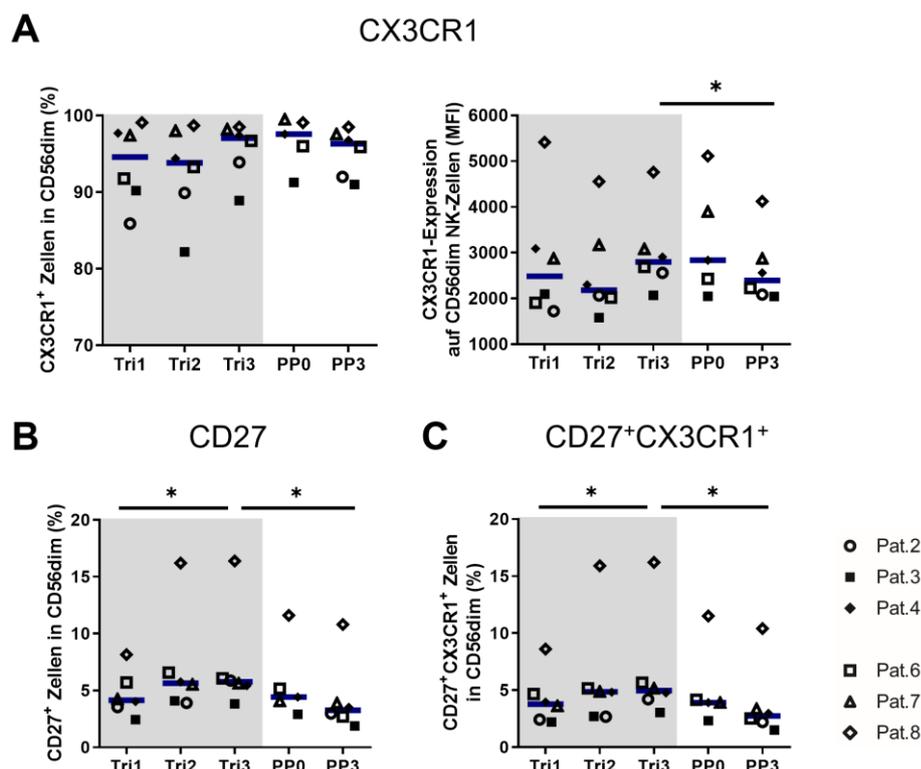
#### *Gesteigerte Expression des IL7-Rezeptor $\alpha$ (CD127) auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen während der MS-Schwangerschaft*

Die  $\alpha$ -Kette des IL7-Rezeptors, auch als CD127 bezeichnet, bildet eine der beiden Ketten dieses heterodimeren IL-Rezeptors. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen weisen eine dim-Expression für CD127 auf, die deutlich unter den CD127-Level der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen liegt (115); so auch in der vorliegenden Studie (siehe Abbildung 7D). Während der Schwangerschaft bei MS zeigte sich eine signifikante Erhöhung der CD127-Expression auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen sowohl in einem erhöhten Anteil der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> Zellen (mediane Paardifferenz: +4,6%;  $p=0,031$ ) als auch in einer gesteigerten

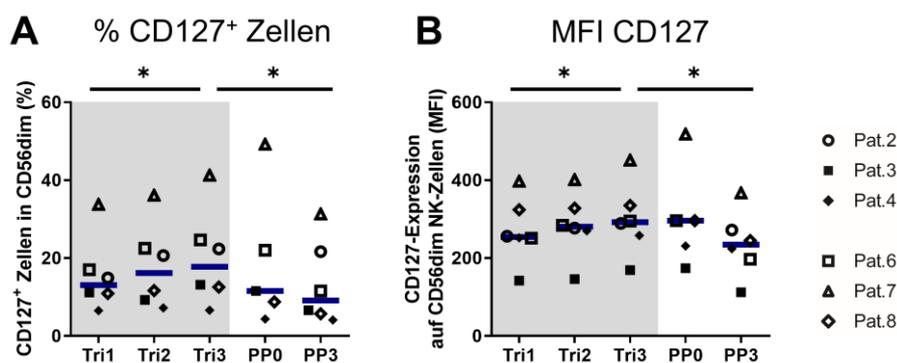
MFI für CD127 ( $p=0,031$ ; siehe Abbildung 23 und Tabelle 20). Die postpartale Phase war wiederum geprägt von einer Reduktion der MFI sowie des Anteils der CD127<sup>+</sup> Zellen (jeweils  $p=0,031$ ). Die Effektstärke lag jeweils bei  $d=1,65$ ; die beobachteten Effekte für CD127 waren demnach als groß zu bewerten.



**Abbildung 21. Aktivierende und inhibierende Rezeptoren auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.** Analysiert wurden die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit CD16<sup>bright</sup> Expression (Gating siehe Abbildung 6A/C und Abbildung 7A/C). Für **(A)** NKp46 ist die Frequenz der Marker-positiven Zellen innerhalb aller analysierten CD56<sup>dim</sup> und die Fluoreszenzintensität (MFI) auf allen CD56<sup>dim</sup> abgebildet. **(B)** Zeigt die Frequenz der CD94/NKG2A<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56<sup>dim</sup> und die Fluoreszenzintensität von NKG2A auf CD94/NKG2A<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $n=6$ , \*,  $p$ -Wert $<0,05$ ). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).



**Abbildung 22. Maturations- und Migrationsmarker auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.** Analysiert wurden die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit CD16<sup>bright</sup> Expression (Gating siehe Abbildung 6A/C und Abbildung 7B). Für **(A)** CX3CR1 ist die Frequenz der Marker-positiven Zellen innerhalb aller analysierten CD56<sup>dim</sup> und die Fluoreszenzintensität (MFI) auf allen CD56<sup>dim</sup> abgebildet. **(B)** Zeigt die Frequenz der CD27<sup>+</sup> Zellen und **(C)** die Frequenz der CD27<sup>+</sup>CX3CR1<sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD56<sup>dim</sup>. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6, \*, p-Wert<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).



**Abbildung 23. CD127-Expression auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.** Analysiert wurden die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit CD16<sup>bright</sup> Expression (Gating siehe Abbildung 6A/C und Abbildung 7D). **(A)** Zeigt die Frequenz (%) der CD127<sup>+</sup> Zellen in allen analysierten CD56<sup>dim</sup>. In **(B)** ist die Fluoreszenzintensität (MFI) von CD127 auf den CD56<sup>dim</sup> abgebildet. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6, \*, p-Wert<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).

**Tabelle 20.** Statistik zur Markerexpression der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen

	Erstes Trimester (Tri1)		Drittes Trimester (Tri3)		3 Monate postpartal (PP3)		Tri1 vs. Tri3		Tri3 vs. PP3		
	Median (IQR) <sup>1</sup>	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median (IQR)	Median der Paardifferenzen (95%-KI <sup>2</sup> )	p-Wert	Cohen's d <sup>3</sup>	Median der Paardifferenzen (95%-KI)	p-Wert	Cohen's d
<b>Aktivierende Rezeptoren</b>											
CD94/NKG2C (%)	3,89 (1,74-8,3)	4,16 (2,58-9,04)	2,95 (1,7-9,46)	0,46 (-0,66; 4,05)	0,313	-0,73 (-1,32; 2,19)	0,438				
NKp46 (%)	64,0 (34,78-72,35)	69,15 (38,75-78,68)	48,5 (23,38-57,9)	5,15 (0,4; 8,3) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	-20,65 (-27,35; -14,3)	<b>0,031</b>	1,646			
NKp46 (MFI)	2238 (1306-3077)	2853 (1460-3332)	1716 (969-2047)	330,5 (50; 614,5) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>	-981,5 (-1705,5; -475)	<b>0,031</b>	1,646			
DNAM1 (MFI)	1325 (1224-1659)	1356 (1233-1537)	1291 (1101-1492)	16,5 (-83,5; 33,5)	0,438	-84 (-162; 16,5)	0,094				
NKG2D (MFI)	3164 (2786-3426)	2938 (2672-3176)	2754 (2213-2930)	-188 (-650; 135)	0,219	-286,5 (-572; -88) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>				
<b>Inhibierende Rezeptoren</b>											
CD94/NKG2A (%)	61,2 (45,0-66,85)	62,05 (47,23-65,48)	50,8 (36,65-55,6)	1,05 (-2,3; 3,6)	0,563	-9,95 (-13,5; -7,9)	<b>0,031</b>	1,646			
CD94/NKG2A+ NKG2A (MFI)	3124 (1979-5097)	3482 (2155-5829)	2838 (1752-4615)	406 (131,5; 819,5)	<b>0,031</b>	-756,5 (-1243,5; -286,5)	<b>0,031</b>	1,646			
<b>Maturation und Migration</b>											
CD27 (%)	4,14 (3,27-6,32)	5,75 (5,03-8,66)	3,26 (2,5-5,62)	1,4 (0,88; 5,3)	<b>0,031</b>	-2,64 (-4,49; -1,82)	<b>0,031</b>	1,646			
CX3CR1 (%)	94,6 (89,13-98,05)	97,05 (92,65-98,27)	96,35 (91,75-97,83)	1,8 (-0,95; 6,45)	0,563	-0,6 (-1,35; 1,05)	0,563				
CX3CR1 (MFI)	2485 (1860-3670)	2798 (2437-3500)	2393 (2076-3184)	92,5 (-418; 811)	0,563	-346 (-555,5; -117)	<b>0,031</b>	1,646			
CD27/CX3CR1+ (%)	3,78 (2,37-5,64)	4,96 (3,92-8,29)	2,75 (2,03-5,11)	1,31 (0,81; 4,7)	<b>0,031</b>	-2,34 (-4,47; -1,66)	<b>0,031</b>	1,646			
CCR7 (MFI)	97,5 (70,7-133,5)	100 (67-153,8)	86,7 (78,7-125,8)	-5,4 (-24,1; 76,6)	0,563	-1,7 (-80,8; 40)	1,000				
<b>Weitere Marker</b>											
CD94 (%)	90,1 (86,75-93,58)	89,4 (87,1-93,83)	84,45 (78,83-92,0)	0,25 (-2,0; 2,35)	1,000	-5,5 (-9,2; -0,55) <sup>a</sup>	0,063 <sup>a</sup>				
CD127 (%)	13,05 (9,81-21,2)	17,8 (11,1-28,85)	9,12 (5,3-24,1)	4,6 (0,89; 7,6)	<b>0,031</b>	-6,74 (-11,55; -1,6)	<b>0,031</b>	1,646			
CD127 (MFI)	254 (223,8-342,3)	292 (235,8-364)	234,5 (175,8-295,8)	30 (8,5; 49)	<b>0,031</b>	-62 (-94; -25,5)	<b>0,031</b>	1,646			

Im linken Teil der Tabelle findet sich die deskriptive Statistik: Zu den einzelnen NK-Zell-Markern ist jeweils der Median für den Anteil der Marker-positiven Zellen (%) bzw. für die Fluoreszenzintensität (MFI) je Studienzeitpunkt angegeben. <sup>1</sup> Interquartilsabstand (IQR, interquartile range). Im rechten Teil der Tabelle sind die Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=6) für die Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) gegen späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft gegen 3 Monate postpartal (PP3) aufgeschlüsselt. Statistisch signifikante Unterschiede bei  $\alpha=0,05$  sind fett gedruckt hervorgehoben. <sup>a</sup> Es sind die exakten p-Werte angegeben, da diese bei kleinen Stichproben geeigneter sind. Die angegebenen Konfidenzintervalle konnten jedoch nur mittels asymptotischer Testung ermittelt werden. Folglich weichen p-Wert und KI hinsichtlich der Signifikanz voneinander ab. <sup>2</sup> 95% Konfidenzintervall (95% KI). <sup>3</sup> Effektstärke d nach Cohen

#### 4.2.4 Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Subsets innerhalb der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen – Ergebnisse der automatisierten Analyse

Zum Zweck der Validierung und Exploration wurden auch die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mittels automatisierter Methoden ausgewertet. Die Citrus-Analyse identifizierte keine CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Subsets, die signifikant mit Schwangerschaft oder postpartaler Phase assoziiert waren. Auch die Ergebnisse der FlowSOM-Analyse, auf die im Folgenden kurz eingegangen wird, enthielten keine substantiellen Hinweise für Subset-spezifische Veränderungen innerhalb der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen.

Analog zum Vorgehen bei den CD56<sup>bright</sup> wurden ebenfalls die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mittels FlowSOM in der Kohorte der acht MS-Patientinnen untersucht (Details zu Methodik und Workflow siehe Kapitel 3.4.2). Auf Basis des Clustering der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen anhand sämtlicher gemessener NK-Zell-Merkmale konnten insgesamt 12 phänotypisch unterschiedliche CD56<sup>dim</sup> Metacluster ausgemacht werden, die sich über verschiedene Regionen des minimalen Spannbaums (MST) verteilten (siehe Abbildung 8A). CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>bright</sup> NK-Zellen gruppieren sich überwiegend in zwei Hauptregionen bestehend aus den drei Metacluster 1, 2 und 10. Die restlichen Metacluster enthielten v.a. CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit einer geringen oder negativen Expression für CD16 (siehe Abbildung 8).

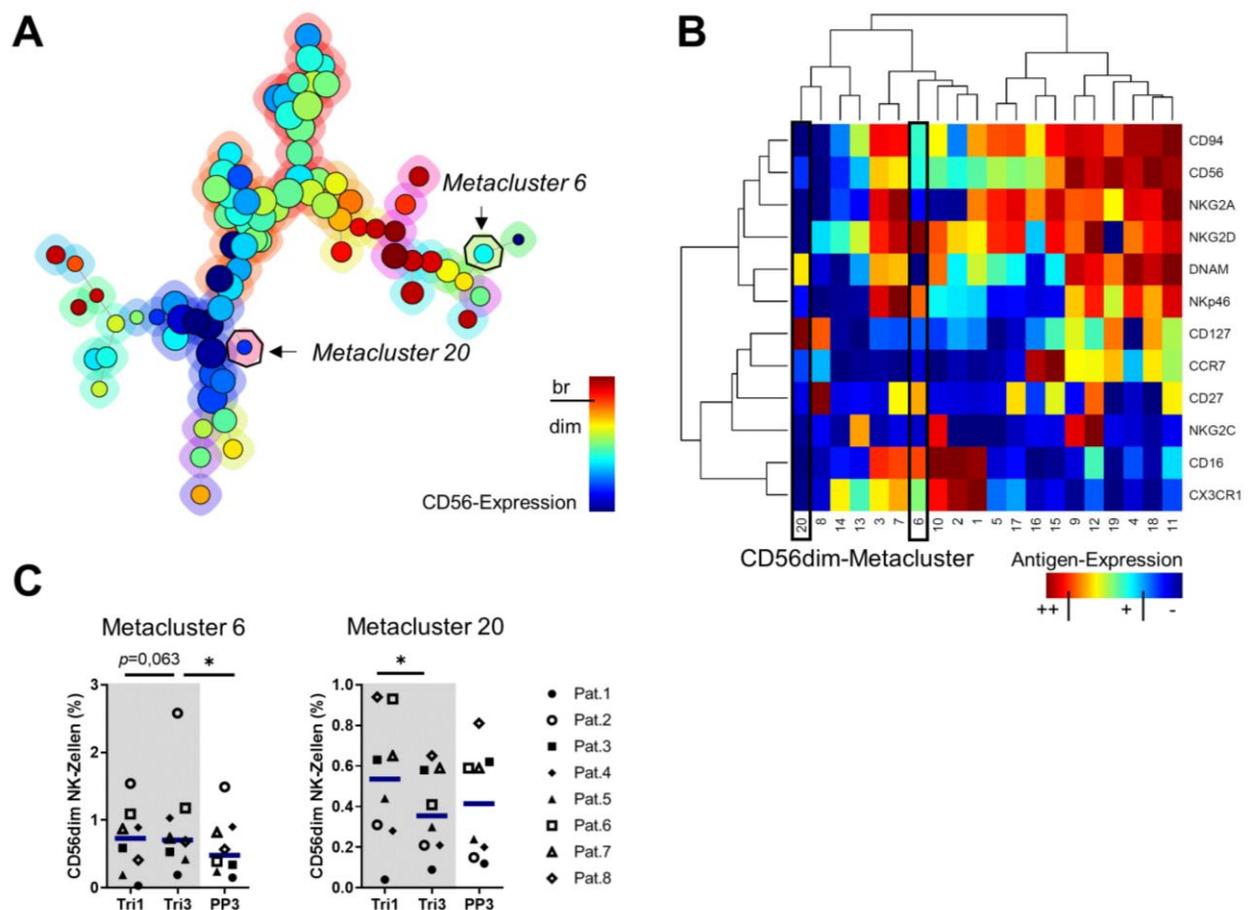
Lediglich ein CD56<sup>dim</sup> Metacluster wies Veränderungen in seiner Zellfrequenz in Schwangerschaft *und* postpartaler Phase auf (siehe Tabelle 21 und Tabelle 18). Metacluster 6 bildete mit einem Anteil von gerade einmal 0,73% aller CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Median Tri1) ein sehr kleines CD56<sup>dim</sup> Subset, das während des dritten Trimesters einen Trend hin zu einem Frequenzanstieg zeigte (mediane Paardifferenz: +0,16%, p=0,063) und dessen Anteil postpartal wieder abfiel (mediane Paardifferenz: -0,17%; p=0,023). Lokalisiert in der CD27<sup>+</sup> Region des MST, enthielt Metacluster 6 sowohl Zellen mit CD16<sup>bright</sup> als auch mit CD16<sup>dim</sup> Expression (siehe Abbildung 24 und Abbildung 8). Neben einer NKp46<sup>+</sup> NKG2D<sup>high</sup> Expression waren die Zellen des Metacluster 6 durch einen CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Phänotyp geprägt, sodass die Veränderung dieses Subsets vermutlich v.a. die bereits manuell gezeigte Zunahme der CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> Zellen widerspiegelt.

Zusätzlich zeigte ein weiteres Metacluster mit einem Anteil von <1% der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen eine Frequenz-Reduktion zum dritten Trimester (p=0,016, siehe Abbildung 24). Es enthielt lediglich CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-</sup> Zellen, die bis auf eine DNAM<sup>+</sup> und CD127<sup>+</sup> Expression alle weiteren NK-Zell-Rezeptoren herunterreguliert hatten.

**Tabelle 21.** Zellfrequenz und Phänotyp der CD56<sup>dim</sup> FlowSOM-Metacluster

Meta-cluster	CD16-Expression	Merkmale des Metaclusters	Tri1	Tri3
			-	-
			Tri3	PP3
6	CD16dim/br	NKG2C- NKp46+ DNAM- NKG2D++ NKG2A- CD27+ CX3CR1+ CCR7- CD94+ CD127-	(↑) <sup>1</sup>	↓
20	CD16-	NKG2C- NKp46- DNAM+ NKG2D- NKG2A- CD27- CX3CR1- CCR7- CD94- CD127++	↓	—

Angegeben ist die Veränderung der Zellfrequenz der FlowSOM-Metacluster innerhalb der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen: ↑, Anstieg; ↓, Reduktion; —, keine Veränderung. Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) vs. späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft vs. 3 Monate postpartal (PP3) erfolgten jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die mittleren Spalten zeigen die Markerprofile der Metacluster. Expressionslevels: (-) keine Expression, (±) Expression nur auf einzelnen Clustern, (+) schwachpositiv exprimiert (dim), (++) hochpositiv exprimiert (br); <sup>1</sup> (↑) zeigt einen nicht signifikanten Trend mit  $p=0,063$ .



**Abbildung 24.** CD56<sup>dim</sup> Metacluster während und nach der Schwangerschaft bei MS. Mittels FlowSOM wurden alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Startpopulation) anhand der Merkmale CD56, CD16, NKG2C, NKp46, DNAM, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7, CD94 und CD127 geclustert (Details zum Workflow

siehe Kapitel 3.4.2). Die Zugehörigkeit der einzelnen Cluster zu den 20 Metacluster ist durch den farbigen Hintergrund der Cluster-Knoten gekennzeichnet. **(A)** Lokalisation der CD56<sup>dim</sup> Metacluster 6 und 20 mit signifikanter Veränderung ihrer Zellfrequenz während/nach der Schwangerschaft. **(B)** Heatmap zur Markerexpression der FlowSOM-Metacluster. Die Zeilen stehen jeweils für ein NK-Zell-Molekül, Spalten repräsentieren die Metacluster. CD56<sup>dim</sup> Metacluster im eingerahmten Bereich. Felder zeigen den Median der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Antigens. Expressionslevel: (-) keine Expression; (+) schwachpositiv exprimiert (dim); (++) hochpositiv exprimiert (br). **(C)** Schwangerschaftsbezogene Veränderungen der Frequenz der CD56<sup>dim</sup> Metacluster. Die Frequenzen zeigen den Anteil der im jeweiligen Metacluster enthaltenen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen an der Startpopulation der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Zellen. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die p-Werte wurden nicht adjustiert (\*, p<0,05). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).

#### 4.2.5 Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Subsets mit gemischter Zusammensetzung aus CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen

In diesem Abschnitt sollen Ergebnisse der automatisierten Analyse beleuchtet werden, die sich nicht klar dem einen oder anderen klassischen NK-Zell-Kompartiment zuordnen lassen. Es handelt sich eher um generelle Muster, die sowohl den schwangerschafts-assoziierten Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> als auch der CD56<sup>dim</sup> betreffen.

*FlowSOM: Metacluster, die CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit einem CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> CD94<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp enthalten, nehmen in der Schwangerschaft zu*

Das FlowSOM-Clustering der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Startpopulation), welches anhand aller durchflusszytometrisch gemessenen NK-Zell-Merkmale erfolgte, generierte zwei Metacluster, die sich während der initialen Annotation der FlowSOM-Cluster in keine der beiden NK-Zell-Populationen CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> einordnen ließen. Eine Beschreibung, wie die Metacluster im Einzelnen annotiert wurden, findet sich in Kapitel 4.1.2. In der Tat enthielten die betreffenden Metacluster 3 und 7 sowohl CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen mit einer CD16<sup>bright</sup> oder CD16<sup>dim</sup> Expression als auch CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, hauptsächlich mit CD16<sup>dim</sup> Expression (siehe Abbildung 15). Die mediane CD56-Expression der beiden Metacluster lag folglich zwischen der der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Metacluster (siehe Abbildung 25A/B).

Die Zellen dieser gemischt zusammengesetzten Metacluster wurden durch einen CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> CD94<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp charakterisiert (siehe Tabelle 22 und Abbildung 25B). Metacluster 7 wies zudem einen NKG2D<sup>high</sup> Phänotyp auf, Metacluster 3 zeigte eine ausgeprägt positive, jedoch nicht hochpositive NKG2D-Expression. Während Metacluster 7 aus CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>±</sup> Zellen bestand, enthielt Metacluster 3 v.a. reife CX3CR1<sup>+</sup> Zellen. Es scheint, dass vor allem die besonders hohe Expression der Rezeptoren NKp46 und CD94/NKG2A – und *nicht* die Zugehörigkeit zu CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> – das bestimmende Kriterium bildete, anhand dessen

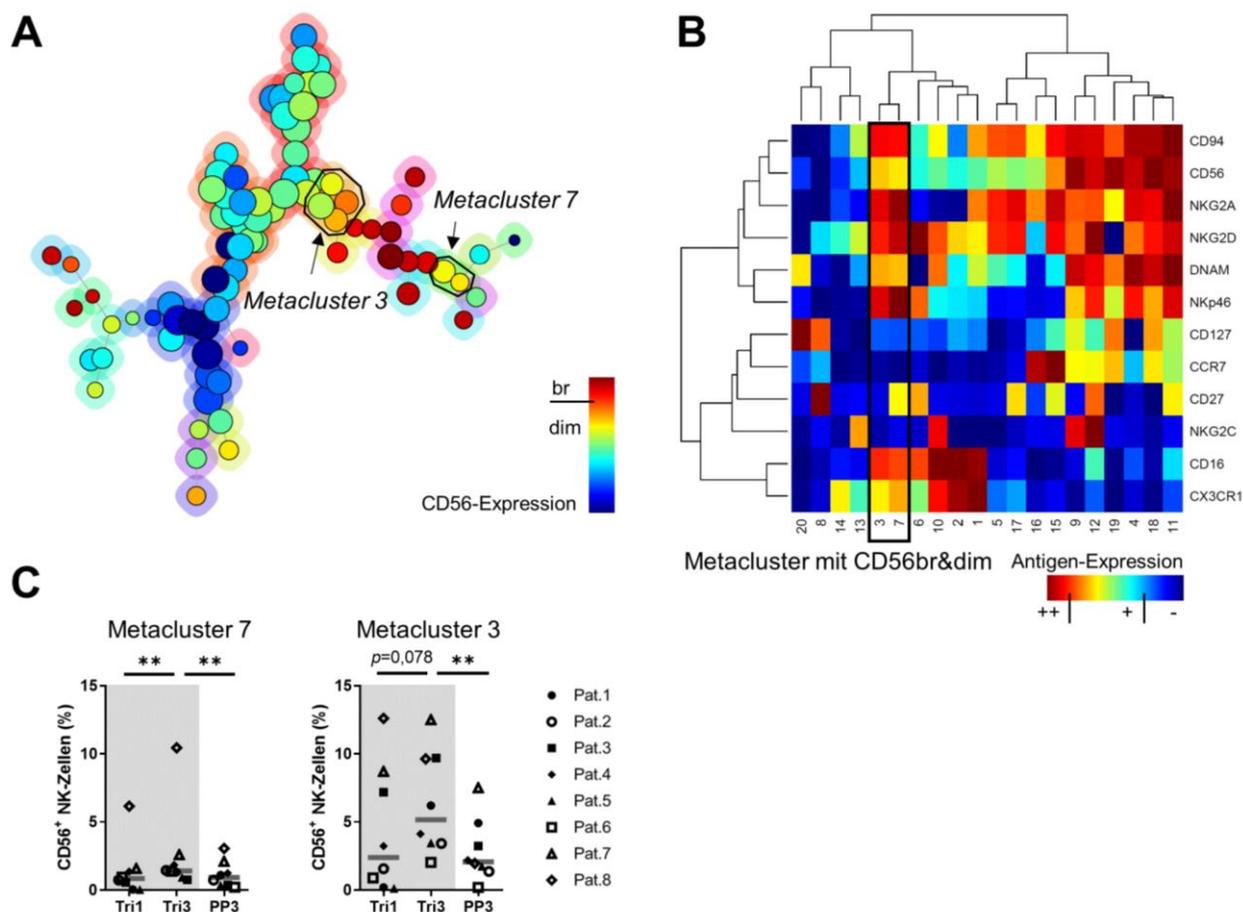
die Zellen in den beiden Metacluster zusammengefügt wurden. Insbesondere im Vergleich zum Rest der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen fällt auf, dass die in Metacluster 3 und 7 enthaltenen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen eine Subpopulation mit deutlich höherer NKp46- und CD94/NKG2A-Expression repräsentieren (siehe CD56<sup>dim</sup> Regionen des MSTs in Abbildung 8).

Interessanterweise expandierten beide Metacluster während der Schwangerschaft gefolgt von einer postpartalen Reduktion. Zwar machten Metacluster 3 und 7 jeweils nur einen geringen Anteil an allen CD56<sup>+</sup> NK-Zellen aus, verdoppelten jedoch ihren Anteil während Schwangerschaft auf gemeinsam 6,57% im dritten Trimester (siehe Abbildung 25C und Tabelle 18). Der Anstieg der Zellfrequenz von Metacluster 7 war signifikant ( $p=0,008$ ); Metacluster 3 zeigte einen Trend hin zu einer Frequenzerhöhung im dritten Trimester (mediane Paardifferenz: +2,21%; 95% KI [-0,23; 3,93];  $p=0,078$ ). In der anschließenden postpartalen Phase reduzierte sich der Anteil beider Metacluster signifikant (jeweils  $p=0,008$ ).

**Tabelle 22.** Zellfrequenz und Phänotyp der FlowSOM-Metacluster mit gemischter Zusammensetzung aus CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen

Meta-cluster	CD16- Expression	Merkmale des Metaclusters	Tri1 — Tri3	Tri3 — PP3
<b>Metacluster mit signifikanter Veränderung prä- und postpartal</b>				
7	CD16dim/br	NKG2C- NKp46++ DNAM+ NKG2D++ NKG2A++ CD27+ CX3CR1± CCR7- CD94++ CD127-	↑	↓
<b>Metacluster mit signifikanter Veränderung postpartal</b>				
3	CD16dim/br	NKG2C- NKp46++ DNAM± NKG2D+ NKG2A++ CD27- CX3CR1+ CCR7- CD94++ CD127-	(↑) <sup>1</sup>	↓

Angegeben ist die Veränderung des Zellfrequenz der FlowSOM-Metacluster innerhalb der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen: ↑, Anstieg; ↓, Reduktion; —, keine Veränderung. Vergleiche der Gruppen frühe Schwangerschaft (Tri1) vs. späte Schwangerschaft (Tri3) sowie späte Schwangerschaft vs. 3 Monate postpartal (PP3) erfolgten jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test ( $n=8$ ). Die mittleren Spalten zeigen die Markerprofile der Metacluster. Expressionslevels: (-) keine Expression, (±) Expression nur auf einzelnen Clustern, (+) schwachpositiv exprimiert (dim), (++) hochpositiv exprimiert (br); <sup>1</sup> (↑) zeigt einen nicht signifikanten Trend mit  $p=0,078$ .



**Abbildung 25. Metacluster mit gemischter Zusammensetzung aus CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen während und nach der Schwangerschaft bei MS.** Mittels FlowSOM wurden alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen (Startpopulation) anhand der Merkmale CD56, CD16, NKG2C, NKp46, DNAM, NKG2D, NKG2A, CD27, CX3CR1, CCR7, CD94 und CD127 geclustert (Details zum Workflow siehe Kapitel 3.4.2). Die Zugehörigkeit der einzelnen Cluster zu den 20 Metacluster ist durch den farbigen Hintergrund der Cluster-Knoten gekennzeichnet. **(A)** Lokalisation der gemischt zusammengesetzten Metacluster im MST. **(B)** Heatmap zur Markerexpression der FlowSOM-Metacluster. Die Zeilen stehen jeweils für ein NK-Zell-Molekül, Spalten repräsentieren die Metacluster. Gemischte Metacluster im eingerahmten Bereich. Felder zeigen den Median der Fluoreszenzintensität des entsprechenden Antigens. Expressionslevel: (-) keine Expression; (+) schwachpositiv exprimiert (dim); (++) hochpositiv exprimiert (br). **(C)** Schwangerschaftsbezogene Veränderungen der Frequenz der gemischten Metacluster. Die Frequenzen zeigen den Anteil der im jeweiligen Metacluster enthaltenen NK-Zellen an der Startpopulation der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Zellen. Vergleich der Gruppen Tri1 vs. Tri3 und Tri3 vs. PP3 erfolgte jeweils mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=8). Die p-Werte wurden nicht adjustiert (Signifikanzniveau \*, p<0,05; \*\*, p<0,01). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin und der Median. Studienzeitpunkte: während des ersten (Tri1), und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft sowie 3 Monate nach Entbindung (PP3).

#### *Citrus: Limitierter Nutzen der Assoziationsmodelle*

Auch Citrus wurde, analog zur Analyse mit FlowSOM, auf alle Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen als Startpopulation angewendet – also nicht nur wie bereits beschrieben auf die CD56<sup>bright</sup> oder CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Ziel war es, dem Ansatz von Validierung und Exploration folgend, zum einen den generellen CD56<sup>bright</sup>/CD56<sup>dim</sup> Shift in der Schwangerschaft bei MS mittels einer weiteren

Analysemethode zu bestätigen und zum anderen Cluster mit spezifischem Markerprofil zu identifizieren, die prägend für den schwangerschafts-assoziierten NK-Zell-Phänotyp sind. Hierzu wurden die Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen in Durchläufen mit verschiedenen Parameter-Einstellungen analysiert, z.B. wurden die identifizierten Cluster entweder auf Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen (Tri1, Tri3, PP3) hinsichtlich ihrer Zellfrequenz oder der medianen Markerexpression ihrer Zellen getestet. Es kam sowohl das prädiktive Assoziationsmodell PAM als auch das korrelative Modell SAM zur Anwendung (siehe Details in Kapitel 3.4.2).

Die entscheidende Limitation der Citrus-Assoziationsmodelle lag in ihrem statistischen Testprinzip, welches auf den Vergleich von ungepaarten Gruppen ausgelegt ist. Für den Kontext der hier durchgeführten Vergleiche zwischen gepaarten Stichproben resultierte eine reduzierte Teststärke (Power) hinsichtlich der Detektion tatsächlich existierender Unterschiede zwischen den Gruppen.

Hierin liegt vermutlich der Grund, weshalb letztlich keine signifikanten Ergebnisse in der Analyse der Gesamtpopulation der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen durch Citrus ermittelt wurden. Zu geringe oder nicht ausreichend robuste Effekte sind natürlich prinzipiell auch denkbar. Im Umkehrschluss bedeutet die geringe Trennschärfe von Citrus jedoch auch, dass das Citrus-Ergebnis zur Expansion der CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft mit hoher Wahrscheinlichkeit tatsächlich wahr ist.

#### 4.2.6 Synopsis zum NK-Zell-Phänotyp im Kontext der MS-Schwangerschaft

Die Kombination aus manueller und automatisierter Analyse ermöglichte es, den NK-Zell-Phänotyp während und nach der MS-Schwangerschaft aus verschiedenen Perspektiven zu beurteilen und potentiell relevante Biomarker (z.B. einzelne NK-Zell-Marker oder NK-Zell-Populationen mit spezifischem Markerprofil) herauszuarbeiten. Diese verschiedenen Ergebnisse sollen nun zu einem Gesamtbild zusammengeführt werden.

##### *Schwangerschaftsbezogener CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Phänotyp*

Als Ausgangspunkt der Analyse der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen diente das manuelle Gating: Die Ergebnisse zeigten während der Schwangerschaft eine gesteigerte Expression der aktivierenden bzw. inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D, NKp46 (Trend) und NKG2A (Trend), die sich postpartal wieder reduzierte. Die Expression des Chemokinrezeptors CCR7 nahm ebenfalls zum dritten Schwangerschaftstrimenon zu, jedoch ohne Veränderung postpartal.

Während das manuelle Gating auf die Auswertung jedes einzelnen NK-Zell-Markers für sich betrachtet fokussierte, eröffnete erst die automatisierte, simultane Analyse aller Marker den Blick auf verschiedenen CD56<sup>bright</sup> Subpopulationen mit jeweils spezifischem Markerprofil. Dabei

bestätigten die Expressionsmuster der identifizierten Subsets weitestgehend die manuellen Ergebnisse. FlowSOM ermittelte innerhalb der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zwei CD16<sup>-dim</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Subpopulationen, die während der MS-Schwangerschaft expandierten; die Größere dieser Subpopulationen zeigte zudem eine hochpositive Expression für NKG2D. Das Citrus-Cluster, welches die Spätschwangerschaft prägte, war ebenfalls durch einen CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp charakterisiert. Für CCR7 zeigte sich ein weniger eindeutiges Bild, was u.a. damit zusammenhängen könnte, dass sich die CCR7<sup>+</sup> Zellen nicht in einem spezifischen Haupt- bzw. Metacluster gruppierten, sondern sich jeweils auf einzelne Cluster innerhalb der verschiedenen Haupt-/Metacluster verteilten. So wies das mit der Schwangerschaft assoziierte Citrus-Cluster lediglich in einer Unterregion eine hochpositive CCR7-Expression auf. Die zwei FlowSOM-Metacluster enthielten einzelne Cluster, die CCR7 exprimierten, der Median der CCR7-Expression dieser beiden Metacluster war jedoch eher gering. Allerdings verfügte ein weiteres FlowSOM-Subset (Metacluster 18) über eine einheitlich positive CCR7-Expression und zeigte zudem einen nicht-signifikanten Trend zur Expansion in der Schwangerschaft.

Zusätzlich lenkten die Algorithmen den Fokus auf ein weiteres Molekül, welches bis dahin in der manuellen Analyse nicht ausreichend erfasst wurde. CD16 prägte den Phänotyp der während der Schwangerschaft expandierenden CD56<sup>bright</sup> Subsets. Unterstützt wurde dieser Befund zum einen durch die manuelle Nachanalyse, die auf einen erhöhten Anteil der CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> Zellen in der späten Schwangerschaft deutet, und zum anderen durch die Zunahme der gemischt-zusammengesetzten FlowSOM-Metacluster in der Schwangerschaft, die neben CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen überwiegend CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit einer CD16<sup>dim</sup> Expression enthielten.

In Zusammenschau aller Ergebnisse erwies sich somit eine CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population als dominierend in der MS-Schwangerschaft. Zudem bestanden Hinweise für eine schwangerschafts-assoziiert erhöhte CCR7-Expression der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.

#### *Schwangerschaftsbezogener CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Phänotyp*

Die manuelle Auswertung der Markerexpression der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen erbrachte folgende Ergebnisse: Ähnlich zu den CD56<sup>bright</sup> wiesen auch die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen einen Trend zu einer erhöhten NKp46- und NKG2A-Expression während der MS-Schwangerschaft auf. Außerdem zeigten die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen der späten Schwangerschaft eine gesteigerte CD127-Expression. Vor allem aber nahm der geringe Anteil der CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Zellen in der Schwangerschaft zu. Der Phänotyp der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in der postpartalen Phase war geprägt von einer teils deutlichen Reduktion verschiedener NK-Zell-Rezeptoren, dazu zählte die reduzierte Expression von NKp46, CD94/NKG2A, CX3CR1 sowie CD127.

Leider gelang es weder mit FlowSOM noch mit Citrus einzelne CD56<sup>dim</sup> Subpopulationen zu identifizieren, die maßgeblich bestimmend für den CD56<sup>dim</sup> Phänotyp während der Schwangerschaft oder postpartalen Phase waren. Lediglich ein FlowSOM-Metacluster mit sehr geringer Zellzahl deutete auf die bereits manuell ermittelte Zunahme der CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> Zellen während der MS-Schwangerschaft.

Insgesamt scheinen die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen während der MS-Schwangerschaft vor allem von der generellen Reduktion ihrer Zellfrequenz geprägt zu sein. Innerhalb dieser reduzierten CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen nehmen CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Zellen sowie die CD127-Expression zu. Postpartal ist der Phänotyp der dann expandierenden CD56<sup>dim</sup> Population durch eine reduzierte Expression einer Reihe von NK-Zell-Rezeptoren bestimmt.

#### *Gemeinsame Merkmale des CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> Phänotyps*

Die Ergebnisse aus den verschiedenen Analyseabschnitten deuten darauf hin, dass die Hochregulierung der Rezeptoren NKp46 und NKG2A – im Sinne eines generellen NK-Zell-Phänomens der MS-Schwangerschaft – sowohl CD56<sup>bright</sup> als auch CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen betrifft. So zeigte sich in der manuellen Analyse für beide NK-Zell-Populationen eine erhöhte bzw. ein Trend zu einer erhöhten NKp46- und NKG2A-Expression während der Schwangerschaft. Weiter bekräftigt wurden diese Ergebnisse durch die Zunahme der Frequenz zweier gemischt aus CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zusammengesetzten FlowSOM-Metacluster mit einem explizit NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp. Die deutlichste Evidenz bestand jedoch für den CD56<sup>bright</sup> Phänotyp. Sowohl in der manuellen, FlowSOM- als auch Citrus-Analyse konnte die Zunahme der NKp46- und NKG2A-Expression während der Schwangerschaft bestätigt werden.

### **4.3 Klinische und radiologische Krankheitsaktivität während und nach der Schwangerschaft bei MS**

Für ein vollständiges Bild zur vorliegenden Pilotstudie ist es erforderlich, die Erkenntnisse zum NK-Zell-Phänotyp im Kontext klinischer und radiologischer Merkmale der untersuchten Kohorte von schwangeren MS-Patientinnen zu betrachten. Zusätzlich wird der Zusammenhang zwischen der radiologischen Krankheitsaktivität und dem NK-Zell-Phänotyp beurteilt.

#### **4.3.1 Klinische Merkmale der Kohorte**

Im Rahmen des Datenbank-Projekts zur Schwangerschaft bei MS (PreCoMS) wurden klinische Daten zur Krankheitsaktivität und Therapie bei jeder Studienvsiste vor, während und nach der Schwangerschaft durch die Mitarbeitenden des NCRC erfasst (siehe Kapitel 3.1.1 und 3.1.2, Übersicht in Abbildung 1).

Die acht Patientinnen, deren NK-Zell-Phänotyp in dieser Arbeit untersucht wurde, zeigten mehrheitlich einen schubförmigen MS-Verlauf (RRMS n=7), bei einer Patientin bestand zum Zeitpunkt des Studieneinschlusses ein klinisch-isoliertes Syndrom (siehe Details zu MS-Aktivität der einzelnen Patientinnen in Tabelle 3). Hinsichtlich der Krankheitsaktivität vor Studieneinschluss teilte sich die Gruppe in drei Patientinnen mit einer relativ kurzen Krankheitsdauer von  $\leq 2$  Jahren seit Erstsymptomatik und jeweils nur einem stattgehabten Schub sowie in fünf Patientinnen mit einer Krankheitsdauer  $\geq 6$  Jahre seit Erstsymptomatik (mit 2-3 Schüben vor Studieneinschluss), wobei sechs der acht Patientinnen in den zwei Jahren vor Studieneinschluss einen Schub hatten. Im Beobachtungszeitraum der Studie stellt sich die Krankheitsaktivität wie folgt dar: Während der Schwangerschaft traten keine Schübe auf. Postpartal erlitt eine Patientin (Pat. 5) im fünften Monat nach Entbindung einen Schub, sodass eine Therapie mit Glukokortikoiden (GK) erfolgte. Leider wurde im Schub (vor GK-Gabe) kein Studienblut abgenommen. Die Probe zum PP6-Zeitpunkt dieser Patientin wurde kurz nach erfolgter GK-Therapie entnommen. Eine Beurteilung der NK-Zellen im Schub war daher aufgrund des Einflusses des Glukokortikoids nicht möglich. Bei einer weiteren Patientin (Pat. 7) bestand postpartal der Verdacht auf einen Schub, es erfolgte eine GK-Therapie kurz vor der Studienvisite PP9.

Der Grad der Behinderung der Patientinnen blieb über den Studienzeitraum stabil. Die Werte nach Expanded Disability Status Scale (EDSS) zeigten keine signifikanten Veränderungen während oder nach der Schwangerschaft (Mittelwert  $\pm$  SD:  $1,4 \pm 0,82$  (Tri1) vs.  $1,3 \pm 1,0$  (Tri3),  $p=0,588$ ;  $0,94 \pm 1,1$  (PP3),  $p=0,462$ ). Das Maximum des EDSS-Scores lag über den gesamten Studienverlauf bei 3 bzw. 2,5 (siehe Abbildung 2).

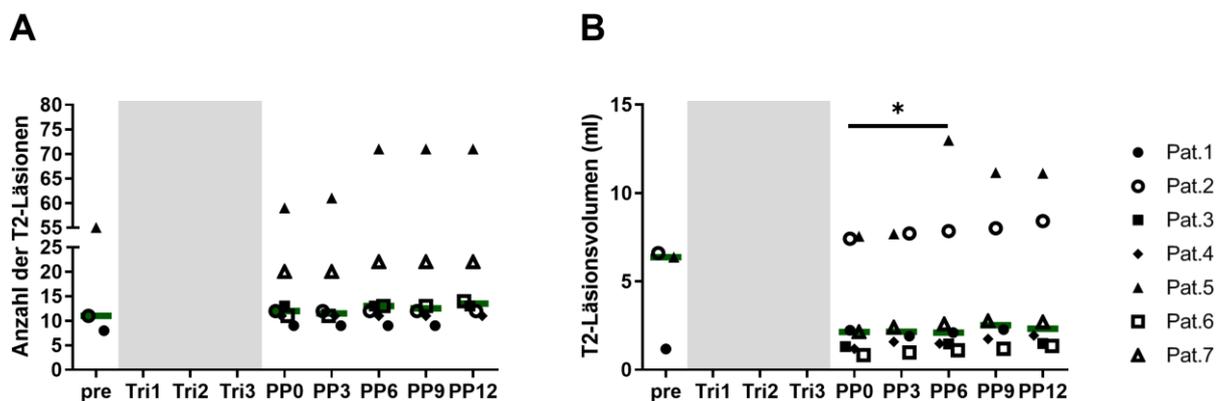
Patientinnen mit längerer Krankheitsdauer wurden vor Studieneinschluss mit krankheitsmodifizierenden Substanzen therapiert (DMT), die zur Schwangerschaft abgesetzt wurde (siehe Details zur Therapie in Tabelle 4). Die Patientinnen mit relativ kurzem Verlauf waren vor der Studie DMT-naiv und erhielten auch über den gesamten Studienverlauf keine DMT. Innerhalb der frühen postpartalen Phase (einschließlich Studienvisite PP3) bekamen bereits zwei Patientinnen eine Dauertherapie (Pat. 3 mit intravenösen Immunglobulinen ab dem 1. Monat pp, Pat. 8 mit Fingolimod ab dem 2. Monat pp). Im Mittel wurde die DMT sieben Monate nach Entbindung wieder begonnen (n=5).

#### **4.3.2 Beurteilung der MS-Aktivität anhand radiologischer Merkmale**

Mittels Magnetresonanztomografie lassen sich die für die MS typischen Läsionen im ZNS nachweisen, anhand derer Rückschlüsse zur inflammatorischen Aktivität der Erkrankung gezogen werden können. Nach dem PreCoMS-Studienprotokoll wurden cerebrale MRT-

Untersuchungen zur Visite vor der Schwangerschaft sowie zu allen postpartalen Zeitpunkten durchgeführt (Übersicht in Abbildung 1). Die Auswertung der Aufnahmen und Bestimmung der Läsionsanzahl/-volumen in der T2-gewichteten Sequenz erfolgte durch das NCRC (siehe Protokoll Kapitel 3.1.4). Die Daten wurden anschließend im Rahmen der vorliegenden Arbeit visualisiert und statistisch analysiert. Da eine Patientin die MRT-Untersuchung ablehnte, beziehen sich die hier dargestellten Ergebnisse zur radiologischen Krankheitsaktivität auf n=7.

Für die postpartale Phase zeichnete sich eine Erhöhung der MS-Läsionslast ab (siehe Abbildung 26). Aufgrund der geringen Fallzahl ist der Zeitpunkt vor der Schwangerschaft nur rein beschreibend abgebildet. Im postpartalen Zeitraum stieg die Anzahl der T2-Läsionen bei Patientin 5 im Rahmen ihres postpartalen Schubs deutlich, bei den anderen Patientinnen aber nur gering (n=2) oder gar nicht an (n=4). Allerdings konnte für das Läsionsvolumen ein signifikanter Anstieg um 0,32 ml vom ersten (PP0) zum sechsten Monate nach Entbindung (PP6) beobachtet werden (Median der Paardifferenzen, 95% KI [0,06; 2,93], p=0,031). Dieser Effekt scheint u.a. durch die Schubaktivität von Patientin 5 beeinflusst. Aber auch bei den anderen Patientinnen zeigte sich postpartal eine (leichte) Erhöhung des Läsionsvolumens als Ausdruck einer vermehrten inflammatorische MS-Aktivität nach der Schwangerschaft.

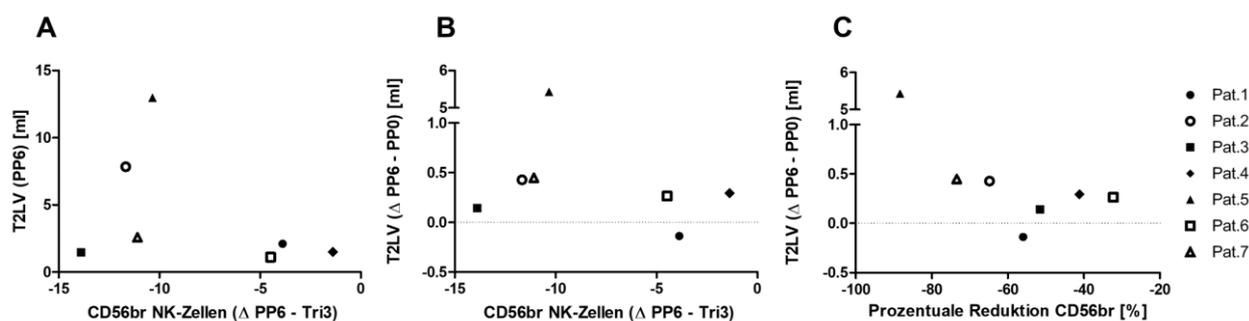


**Abbildung 26. Läsionslast vor und nach der Schwangerschaft bei MS.** MS-typische Läsionen wurden in der T2-gewichteten MRT-Sequenz nachgewiesen. **(A)** Anzahl der T2-Läsionen. **(B)** Volumen aller zu einem Zeitpunkt nachgewiesenen T2-Läsionen in Millilitern (ml). Der Vergleich PP0 vs. PP6 erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (n=7). Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende) und der Median. Studienzeitpunkte und Anzahl der verfügbaren MRT-Messungen: Vor der Schwangerschaft (pre, n=3). Während des ersten (Tri1), zweiten (Tri2) und dritten Trimenons (Tri3) der Schwangerschaft wurde kein MRT durchgeführt. Innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 6 und 12 Monate nach Entbindung (PP6, PP12) jeweils n=7. Zu den Zeitpunkten 3 und 9 Monate nach Entbindung existierten keine Aufnahmen für Pat. 3, daher n=6.

### 4.3.3 Zusammenhang zwischen Läsionslast und NK-Zell-Phänotyp in der postpartalen Phase

Die Volumenzunahme der T2-gewichteten Läsionen in der MRT weist auf eine erhöhte entzündliche Aktivität der MS in der postpartalen Phase. Gleichzeitig konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population – in der Literatur als regulatorisches Subset mit potentiell protektivem Einfluss auf die MS beschrieben (22) – postpartal substantiell abnimmt (siehe Kapitel 4.1.2). Vor diesem Hintergrund stellte sich die Frage, inwieweit die vermehrte radiologische Krankheitsaktivität in der postpartalen Phase mit der Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen assoziiert ist. Aufgrund der geringen Fallzahl dieser Studie (n=7 für die MRT-Ergebnisse) und der damit verbundenen geringen statistischen Power wurde von einer klassischen Korrelationsanalyse nach Spearman abgesehen. Stattdessen wurde die Frage rein deskriptiv untersucht.

Abbildung 27 stellt das T2-Läsionsvolumen zum Zeitpunkt PP6 (A) bzw. dessen Entwicklung in den ersten sechs postpartalen Monaten (B, C) dem Abfall der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gegenüber. Hierbei fielen vier Patientinnen mit einer relativ starken Reduktion ihrer CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auf (siehe Differenz der CD56<sup>bright</sup> Zellfrequenz zwischen Tri3 und PP6 in Abbildung 27 A/B). Zwei dieser Patientinnen wiesen ein deutlich erhöhtes absolutes Läsionsvolumen zum Zeitpunkt PP6 auf, darunter Patientin 5 mit dem postpartalen Schub, und drei Patientinnen (Pat. 2, 5 und 7) dieser Gruppe zeigten eine stärkere Erhöhung des Läsionsvolumens innerhalb der ersten sechs postpartalen Monate als die Patientinnen mit geringem CD56<sup>bright</sup> Abfall. Diese drei Patientinnen wiesen auch prozentual in Bezug auf den Ausgangswert zu Tri3 die größte Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz auf (siehe Abbildung 27C). Eine sichere Aussage zum Zusammenhang postpartale Läsionslast und Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ließ sich auf dieser Grundlage jedoch nicht treffen.



**Abbildung 27. Zusammenhang zwischen dem postpartalen Läsionsvolumen und der Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.** Mittels Gating wurde die Frequenz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen innerhalb aller Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen bestimmt. Als Maß des postpartalen CD56<sup>bright</sup> Abfalls wurde die Differenz der CD56<sup>bright</sup> Frequenzwerte zwischen Zeitpunkt Tri3 und PP6 ( $\Delta$  PP6-Tri3 in A und B, Angabe in %) sowie die Reduktion der CD56<sup>bright</sup> Frequenz in Prozent vom Ausgangswert zum Zeitpunkt Tri3 ( $100 \times (\text{PP6-Tri3})/\text{Tri3}$  in C, Angabe in %) berechnet. Die Werte zum Volumen aller T2-gewichteten Läsionen (T2LV) wurden vom

NCRC bereitgestellt. **(A)** trägt das absolute T2-Läsionsvolumen und **(B)** die Volumenveränderung von PP0 zu PP6 ( $\Delta$  PP6-PP0 in ml) gegen die Reduktion der CD56<sup>bright</sup> Frequenz ( $\Delta$  PP6-Tri3) auf. **(C)** zeigt den Zusammenhang von Volumenveränderung von PP0 zu PP6 ( $\Delta$  PP6-PP0 in ml) und Reduktion der CD56<sup>bright</sup> Frequenz in Prozent vom Ausgangswert zum Zeitpunkt Tri3. Dargestellt sind die individuellen Datenpunkte pro Patientin (Legende). Studienzeitpunkte: während des dritten Trimenons der Schwangerschaft (Tri3) und innerhalb des ersten Monats (PP0) sowie 6 Monate nach Entbindung (PP6).

## 5 Diskussion

Die Schwangerschaft bei MS geht mit einer substantiellen Reduktion der Krankheitsaktivität einher. Für diesen protektiven Effekt existieren seit langem robuste Belege aus zahlreichen Studien. Kaum verstanden sind hingegen die biologischen Mechanismen, die eine solche Protektion vor autoimmuner Aktivität vermitteln. Um zu einem besseren Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen beizutragen, lag der Fokus dieser Promotionsarbeit in der Untersuchung des Immunphänotyps der NK-Zellen des peripheren Bluts während und nach der Schwangerschaft bei MS. Die mittels multiparametrischer Durchflusszytometrie generierten Daten wurden nach drei Aspekten analysiert.

Erstens, es wurden die Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen untersucht. Hier zeigte sich eine signifikante Zunahme der Frequenz der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im dritten Trimester der Schwangerschaft gefolgt von einer Reduktion in den ersten drei postpartalen Monaten. Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen wiesen ein inverses Muster auf. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass während der Schwangerschaft bei MS ein regulatorischer NK-Zell-Phänotyp induziert wird.

Zweitens, anhand einer vertiefenden Analyse zur Expression von NK-Zell-Markern mit Relevanz für Zellaktivierung, Migration und Maturation konnte ein detailreiches Bild vom NK-Zell-Phänotyp im Kontext der Schwangerschaft bei MS entwickelt werden. Am auffälligsten zeigte sich zum einen die Hochregulierung der Rezeptoren NKp46 und NKG2A in der Schwangerschaft, die populationsübergreifend sowohl CD56<sup>bright</sup> als auch CD56<sup>dim</sup> betraf. Zum anderen gelang hinsichtlich der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen die Identifikation einer Subpopulation mit CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp, die das vorherrschende CD56<sup>bright</sup> Subset während der Schwangerschaft bildete.

Drittens, mit Blick auf die deskriptiv berichteten Merkmale zur klinischen und radiologischen Krankheitsaktivität koinzidierte in der postpartalen Phase die Zunahme des Läsionsvolumens in der MRT mit der Reduktion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen.

Die vorliegende Pilotstudie kombiniert den Informationsgehalt der zeitlich hochauflösend, längsschnittlich verfolgten Studienkohorte (inkl. radiologischen Daten) mit den Stärken der multidimensionalen Durchflusszytometrie. Auf Basis einer Synthese von konventioneller Analyse und neuen, Algorithmen-basierten Methoden konnten erstmals detaillierte Erkenntnisse zum NK-Zell-Phänotyp in Schwangerschaft und postpartaler Phase bei MS gewonnen werden, die über die bisherige reine Enumeration der NK-Zellen und ihrer prototypischen Populationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> hinausgehen.

Im Folgenden werden die Erkenntnisse der drei Teilbereiche der Arbeit in den Kontext von Immuntoleranz und Autoimmunität eingeordnet. Aufgrund des deutlichen Einflusses der

Schwangerschaft auf die autoimmune Krankheitsaktivität kann diese als informatives Forschungsparadigma zur Identifikation protektiver und destruktiver Immunmechanismen herangezogen werden. Aus den Ergebnissen zum NK-Zell-Phänotyp in der Schwangerschaft lassen sich folglich Hypothesen zur generellen Rolle und Funktion der NK-Zellen in der Pathogenese der MS ableiten.

## 5.1 Proportionen der klassischen NK-Zell-Populationen

CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bilden die beiden prototypischen NK-Phänotypen des peripheren Bluts, denen unterschiedliche physiologische Funktionen innerhalb des Immunsystems zugewiesen werden. Grob vereinfacht fungieren CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen v.a. als hochpotente zytotoxische Killerzellen, während CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als regulatorische Zellen die angeborene und adaptive Immunität modulieren (siehe Kapitel 1.1.1). Welche Bedeutung NK-Zellen für die Pathogenese der MS haben, ist nicht abschließend geklärt. Vieles deutet jedoch auf kompromittierte immunregulatorische NK-Zell-Funktionen hin (siehe Kapitel 1.2.2).

Vor diesem Hintergrund konnte im ersten Teil dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass die klassischen NK-Zell-Populationen CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> einem ausgeprägten Shift während Schwangerschaft und postpartaler Phase bei MS unterliegen. Vom ersten zum dritten Trimester der Schwangerschaft nahm die Frequenz der zirkulierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (definiert als CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-/dim</sup>) signifikant zu und die der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen (definiert als CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>-/dim/bright</sup>) signifikant ab. Innerhalb der ersten drei postpartalen Monate zeigte sich eine deutliche Reduktion der CD56<sup>bright</sup> sowie Zunahme der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Der NK-Zell-Shift ließ sich sowohl in der initialen manuellen Analyse als auch in der zur Bestätigung durchgeführten Algorithmen-basierten Analyse mit hoher Übereinstimmung belegen.

### 5.1.1 Weitere Studien zu den NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS

Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, nach der die Schwangerschaft bei MS-Patientinnen einen regulatorischen NK-Zell-Phänotyp induzieren könnte, und reproduzieren die Beobachtungen zur Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS (92), auf denen diese Hypothese maßgeblich beruht. In dieser bislang größten längsschnittlichen Studie (n=42) zum Immunphänotyp bei Schwangerschaft und MS von Airas et al. zeigte sich in einer repräsentativen Subgruppe von 12 MS-Patientinnen ein Anstieg der Frequenz der zirkulierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zum dritten Trimester der Schwangerschaft sowie eine gleichzeitige Reduktion der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. In der darauffolgenden postpartalen Phase nahm der Anteil der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wieder ab. Weil die Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zusätzlich mit dem Rückgang der MS-Aktivität während der Schwangerschaft in Form einer

reduzierten jährlichen Schubrate assoziiert war, rückten diese Zellen als potentielle Modulatoren von Autoimmunität während der Schwangerschaft in den Fokus.

Angesichts der vielfach thematisierten Replikationskrise in der Biomedizin (124) wird die Bedeutung von valider, reproduzierbarer Forschung deutlich. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen – unter Beachtung ihrer Limitationen – dazu bei, eine robustere Erkenntnislage zu den NK-Zellen im Kontext der Schwangerschaft bei MS zu schaffen. Auf Grundlage weitestgehend vergleichbarer Versuchsbedingungen, u.a. hinsichtlich des Studiendesigns und der gewählten Studienzeitpunkte, der Definition der CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population sowie des verwendeten Zellmaterials, konnte die von Airas et al. (92) beschriebene NK-Zell-Dynamik auch hier nachgewiesen werden.

Darüber hinaus ist der Kenntnisstand zu den NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS jedoch sehr begrenzt. Lediglich zwei weitere Studien untersuchten die Frequenz der peripheren CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen mittels querschnittlichem Ansatz (94, 95). In beiden Fällen konnte bei schwangeren MS-Patientinnen keine Erhöhung der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beobachtet werden. Für die differierenden Ergebnisse kommen verschiedene Gründe in Betracht. Zum einen bezogen sich sowohl Spadaro et al. (94) als auch de Andrés et al. (95) nur auf die CD16-negativen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen und wichen somit von der hier und von Airas et al. (92) verwendeten CD56<sup>bright</sup> Definition ab, die alle CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen (CD16<sup>-</sup> und CD16<sup>dim</sup>) einbezog. Wie in dieser Arbeit gezeigt, scheinen aber v.a. die CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>dim</sup> während der Schwangerschaft bei MS zuzunehmen. Außerdem wurde in beiden Studien ein querschnittliches Design gewählt, sodass interindividuelle Variationen der NK-Zell-Frequenz die Ergebnisse beeinflusst haben könnten. Andrés et al. (95) verglichen zudem nicht erstes mit drittem Trimenon, sondern die Gruppe nicht-schwangerer MS-Patientinnen mit schwangeren MS-Patientinnen, wobei nicht explizit beschrieben wurde in welchem Abschnitt der Schwangerschaft das Sampling erfolgt.

### **5.1.2 Schwangerschafts-assoziierte NK-Zell-Dynamik bei gesunden und vorerkrankten Frauen**

Der Blick auf andere Kontexte, in denen zirkulierende NK-Zellen während der Schwangerschaft untersucht wurden wie z.B. bei anderen Autoimmunerkrankungen, gesunden Schwangeren und Frauen mit Schwangerschaftskomplikationen, kann helfen, die begrenzten Erkenntnisse zur MS einzuordnen und um entscheidende Perspektiven zu erweitern. Zwei immunologische Studien zu Typ1 Diabetes mellitus (T1D) und Schwangerschaft analysierten ebenfalls CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen. Während die längsschnittliche Analyse weder in der T1D- noch in der gesunden Kontrollgruppe eine signifikante Veränderung der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> im Verlauf der Schwangerschaft zeigte (125), wurde in der Querschnitts-Studie im Vergleich zwischen nicht-

schwangeren und schwangeren T1D-Patientinnen ein Trend zu einer reduzierten CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> Ratio in der späten Schwangerschaft beobachtet (126). Abseits von MS und T1D konnten keine weiteren Studien zur schwangerschafts-assoziierten Entwicklung der NK-Zell-Populationen bei Autoimmunerkrankungen identifiziert werden.

In allen bisher besprochenen Studien wurden die NK-Zellen zusätzlich auch in einer Kohorte gesunder Schwangerer analysiert; eine Kondition, die in diesem Promotionsprojekt nicht realisiert werden konnte. Interessanterweise wiesen bis auf die Analyse von Burke et al. (125) alle Studien in dieselbe Richtung: Bei gesunden Frauen nahm im Verlauf der Schwangerschaft ebenfalls der Anteil der CD56<sup>bright</sup> Population zu, was sowohl in der längsschnittlich verfolgten Kohorte gesunder Schwangerer von Airas et al. (92) als auch querschnittlich als erhöhte Frequenz der CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> NK-Zellen (94, 95) bzw. als erniedrigte CD56<sup>dim</sup>/CD56<sup>bright</sup> Ratio nachgewiesen wurde (126). In einer großen Studie zur viralen Immunität im Kontext der Schwangerschaft (VIP-Studie) wurde unterdes bei 50 gesunden Frauen längsschnittlich im Verlauf der Schwangerschaft und postpartalen Phase statt der relativen Frequenz die absolute Zellzahl der CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bestimmt (127). Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen im zweiten und dritten Trimester im Vergleich zur CD56<sup>dim</sup> Zellzahl sechs Monate postpartal, jedoch keine Veränderung der absoluten Zahl der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. Diese Ergebnisse sind mit der hier und anderswo beobachteten relativen Zunahme der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen vereinbar; denn nimmt die Zahl der CD56<sup>dim</sup> im Verlauf der Schwangerschaft ab, steigt folglich der relative Anteil der CD56<sup>bright</sup> innerhalb des NK-Zell-Kompartiments, auch wenn die absolute Zahl der CD56<sup>bright</sup> gleichbleibt. Die VIP-Studie legt jedoch eine Limitation aller NK-Zell-Studien zur Schwangerschaft bei MS inklusive der hier vorliegenden Arbeit offen. Die relative Frequenz stellt zwar eine valide Angabe dar, um Veränderungen der NK-Zell-Subsets im Verhältnis zueinander zu beschreiben, allerdings kann allein darauf basierend keine Aussage zur Entwicklung der absoluten NK-Zellzahlen getroffen werden.

Zahlreicher, aber weniger spezifisch sind Informationen zur Zellzahl und/oder Frequenz des gesamten NK-Zell-Kompartiments im peripheren Blut von Schwangeren, wobei relativ uneinheitlich entweder alle CD56<sup>+</sup> Zellen oder nur die CD16<sup>+</sup> Zellen erfasst wurden. In dieser Promotionsarbeit wurde erstmals der Anteil der Lin<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Zellen an den Lymphozyten im Verlauf der Schwangerschaft bei MS bestimmt, ohne eine Veränderung zu beobachten. Studien zur Frequenz der CD56<sup>+</sup> NK-Zellen bei gesunden Schwangeren liefern widersprüchliche Ergebnisse. Einige zeigten ebenfalls keine Veränderung (128, 129), wohingegen andere eine reduzierte CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> Zellfrequenz berichteten (130). Auch Groen et al. (126) konnten keine Veränderung in der späten Schwangerschaft bei gesunden Kontrollen und T1D-Patientinnen nachweisen, ermittelten aber zusätzlich die absolute Zahl der Lymphozyten und CD3<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen. Hierbei wurde eine Reduktion der Lymphozyten und NK-Zellen in der Gruppe der gesunden Schwangeren

offensichtlich, jedoch nicht bei den T1D-Patientinnen, die eine unverändert geringe NK-Zellzahl zeigten. Zu den CD16<sup>+</sup> NK-Zellen scheint das Bild in der gesunden Schwangerschaft eindeutiger, deren Zahl und Frequenz nimmt im Verlauf der Schwangerschaft ab (131-133). Auch in der Studie von Airas et al. (92) fiel der Anteil der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen zur späten Schwangerschaft ab – und zwar in vergleichbarer Weise sowohl bei den gesunden Kontrollen als auch bei den MS-Patientinnen. Da CD16<sup>+</sup> NK-Zellen zum weitaus größten Teil aus CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen bestehen, spiegelt die Abnahme der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen vermutlich v.a. die sowohl bei Gesunden als auch bei MS-Patientinnen beobachtete CD56<sup>dim</sup> Reduktion während der Schwangerschaft wider (siehe oben). Für die postpartale Phase wurde wiederum ein Anstieg der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen bei MS-Patientinnen und Gesunden berichtet (92, 131), was im Einklang mit der postpartalen Erhöhung der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen und der Zunahme der CD56<sup>+</sup> NK-Zellfrequenz (Trend) in der hier untersuchten MS-Kohorte steht. Interessanterweise war ein gutes Ansprechen auf eine postpartale Interferon-Therapie zur Prävention postpartaler Schübe mit einer substantiellen Reduktion der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen assoziiert (134).

Im Kontrast hierzu zeigen Frauen mit wiederholten Spontanaborten erhöhte Level von CD56<sup>+</sup> NK-Zellen im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowohl vor als auch während der Schwangerschaft (129), was v.a. auf einen erhöhten Anteil der CD16<sup>+</sup> NK-Zellen zurückzuführen sein könnte (135). Ebenfalls erhöht sind NK-Zell-Zahl und -aktivität bei Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (Messung bei Nicht-Schwangeren), einer Kondition, die zudem mit einer gesteigerten Prävalenz von Infertilität und Spontanaborten verbunden ist (136).

Zusammengefasst deuten die Beobachtungen daraufhin, dass die Verschiebung der NK-Zellen zugunsten der regulatorischen CD56<sup>bright</sup> kein isoliert MS-spezifisches Phänomen darstellt, sondern vielmehr einen grundsätzlichen Mechanismus der endogenen Immunregulation während einer erfolgreichen Schwangerschaft. In der Tat hat der evolutionäre Druck auf die plazentare Schwangerschaft eine nuancierte Immunregulation hervorgebracht, die die Toleranz des maternalen Immunsystems gegenüber fetalen Alloantigenen bei gleichzeitig erhaltener Immunkompetenz gegenüber Pathogenen induziert (71, 137). Ob es sich bei dem systemischen Shift der NK-Zell-Populationen um einen regulatorischen Prozess handelt, der im Rahmen der Evolution der plazentaren Schwangerschaft selektioniert wurde, oder eher um eine sekundäre Antwort auf das tolerogene Milieu der Schwangerschaft, bleibt zu klären. Jedenfalls kann vermutet werden, dass der Kontakt mit fetalen Antigenen immunregulatorische Vorgänge im maternalen Immunsystem anstößt, die nicht nur zum Erhalt der Schwangerschaft beitragen, sondern im Nebeneffekt auch die Toleranz gegenüber den Autoantigenen der MS wiederherstellen (82).

### 5.1.3 NK-Zell-Dynamik im Kontext der exogen induzierten Immunmodulation

Im Sinne einer exogenen Immunmodulation führen auch verschiedene MS-Therapeutika (sog. disease modifying drugs, DMT) zu einer Expansion der peripheren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen. So wurde eine Zunahme des relativen Anteils bzw. der absoluten Zellzahlen der CD56<sup>bright</sup> während der Behandlung mit den Substanzen Interferon- $\beta$  (134, 138), Dimethylfumarat (DMF) (139) und Alemtuzumab (140) beobachtet. Welche Mechanismen den Anstieg der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen vermitteln, ist kaum geklärt. Eine erhöhte systemische Verfügbarkeit von Zytokinen oder aber deren vermehrte Sekretion wurde vermutet (141). Die eindrücklichsten Erkenntnisse zur Modulation der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen lieferte der inzwischen nicht mehr zugelassene Antikörper Daclizumab. Ursprünglich sollte mittels Daclizumab eine direkte Inhibition der T-Zell-Aktivierung erreicht werden, indem der high-affinity IL-2-Rezeptor der T-Zellen über die IL2-R $\alpha$ (CD25)-Kette blockiert wird. Es zeigte sich aber nur eine geringfügig gehemmte T-Zell-Antwort (142). Stattdessen wurde eine deutliche Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen sowohl im peripheren Blut (142, 143) als auch im Liquor beobachtet (144). Ursächlich hierfür, die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen exprimieren v.a. den intermediate-affinity IL-2R (ohne CD25-Kette), im Vergleich zu T-Zellen und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen in hoher Dichte, sodass die höhere Verfügbarkeit von IL-2 (infolge der IL-2R $\alpha$  Blockade auf den T-Zellen) zur Aktivierung und Proliferation der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beiträgt (145). Obwohl verschiedenste Therapiemechanismen mit einer robusten Zunahme der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen einhergehen, könnte diese Zunahme mehr als nur ein Epiphänomen der DMTs darstellen. Unter Therapie mit Daclizumab zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen CD56<sup>bright</sup> Expansion und der Reduktion der radiologischen Aktivität im MRT (142), sodass vermutet wird, dass die CD56<sup>bright</sup> zu einem Teil des therapeutischen Effekts von Daclizumab beitragen (146). Überdies war das Therapieansprechen auf IFN- $\beta$  und DMF mit einem CD56<sup>bright</sup> Anstieg bzw. erhöhten NKG2A<sup>+</sup> NK-Zellen im peripheren Blut verbunden (138, 139).

Im Rahmen endogen wie auch exogen induzierter Immunmodulation verschiebt sich die NK-Zell-Balance zugunsten der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen; die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen hingegen nehmen ab. Diese Entwicklung ist sowohl im Fall der Schwangerschaft bei MS als auch im Kontext der verschiedenen MS-Therapien mit einer reduzierten inflammatorischen Krankheitsaktivität assoziiert. Ein protektiver Einfluss der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der MS wird hier denkbar, doch kann die alleinige Beobachtung der prototypischen NK-Zell-Phänotypen nur als erster Hinweis für deren mögliche funktionelle Rolle gewertet werden.

## 5.2 Detaillierte Charakterisierung des NK-Zell-Phänotyps

Um der Rolle und Funktion der NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS näher zu kommen, erfolgte im zweiten Teil dieser Arbeit eine tiefere Exploration des NK-Zell-

Phänotyps. Die multiparametrische Durchflusszytometrie sowie neue, Algorithmen-basierte Analysemethoden ermöglichten es, die Expression von 12 ausgewählten NK-Zell-Molekülen mit Bedeutung für Zellaktivierung, Migration und Maturation (siehe Tabelle 11) simultan auszuwerten. Auf diese Weise wurde hier zum ersten Mal der NK-Zell-Phänotyp während der Schwangerschaft und postpartalen Phase bei MS im Detail beschrieben.

Es zeigte sich, dass die Schwangerschaft bei MS zu spezifischen Veränderungen im NK-Zell-Phänotyp führt (siehe Kapitel 4.2). Allem voran regulierten CD56<sup>bright</sup> und CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen die Expression der Rezeptoren NKp46 und NKG2A zur späten Schwangerschaft hin im Sinne eines generellen NK-Zell-Phänomens hoch, wofür sich sowohl in der manuellen als auch automatisierten Analyse Belege fanden. Zusätzlich stieg die NKG2D-Expression auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft deutlich an. Anhand der Clustering-Algorithmen wurde ein entsprechendes CD56<sup>bright</sup> Subset mit einem CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp identifiziert, welches während der Schwangerschaft zunahm und im dritten Trimester die relative Mehrheit der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen bildete.

### 5.2.1 Potentielle Auswirkungen auf die NK-Zell-Aktivität

Die vorliegende Arbeit stellt die erste tiefgehende Phänotypisierung-Studie zu den NK-Zellen im Kontext der Schwangerschaft bei MS dar, vergleichbare Vorergebnisse zu den NK-Zellen von schwangeren MS-Patientinnen fehlen entsprechend. Interessanterweise lieferte aber eine Deep Profiling Studie zum NK-Zell-Phänotyp in der gesunden Schwangerschaft ähnliche Ergebnisse (147). Sowohl in der dort verwendeten Explorations- als auch in der Validierungs-Kohorte zeigte sich die NKp46-Expression der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen von gesunden Schwangeren im Vergleich zu nicht-schwangeren gesunden Frauen erhöht. Auch NKG2A wurde während der Schwangerschaft verstärkt auf CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen exprimiert, allerdings nur in der Validierungs-Kohorte. Erstaunlich ähnlich erschienen auch die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Explorations-Kohorte: eine gesteigerte Expression von NKp46, NKG2D und NKG2A war prädiktiv für den CD56<sup>bright</sup> Phänotyp während der gesunden Schwangerschaft. Hinsichtlich der Vergleichbarkeit der Ergebnisse sollte beachtet werden, dass Le Gars et al. ein querschnittliches Studiendesign verwendeten und die Gruppe der Schwangeren sowohl aus Frauen im zweiten als auch dritten Trimester bestand. Zudem ist ganz grundsätzlich bei der Interpretation der vorgestellten Ergebnisse zu bedenken, dass die Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren erheblich durch verschiedene Umwelteinflüsse wie Infektionen beeinflusst werden kann (13). Die Robustheit der beobachteten Effekte könnte entsprechend beeinträchtigt sein. Dennoch zeichnet sich eine Tendenz zur erhöhten Expression von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren v.a. von NKp46 auf den NK-Zellen schwangerer Frauen mit und ohne MS ab. Weiter unterstützt wird dieses Bild durch die Studie von Groen et al. (126), nach der auch NK-Zellen von schwangeren T1D-Patientinnen und CD56<sup>dim</sup> von gesunden

Schwangeren über eine erhöhte NKp46-Expression verfügen. Überdies in Richtung NK-Zell-Aktivierung deuten Beobachtungen, die erhöhte Level von Aktivierungsmarkern auf den NK-Zellen von schwangeren Frauen zeigen; zum einen von CD38 in der Schwangerschaft von Gesunden (147) und zum anderen von CD69 in der Schwangerschaft bei MS (95).

Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass die erhöhte Expression der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKp46 und NKG2D in einer gesteigerten Responsivität der NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS resultieren könnte. Gleichzeitig wird jedoch das inhibitorische Rezeptorheterodimer CD94/NKG2A verstärkt exprimiert. Da die NK-Zell-Aktivierung in einem dynamischen Gleichgewicht aus aktivierendem und inhibierendem Rezeptorinput reguliert wird (9), wäre folglich ebenfalls eine unveränderte oder reduzierte NK-Zell-Responsivität möglich. Allerdings kann die simultane Hochregulierung des inhibierenden NKG2A auch als Ausdruck der NK-Zell-Education verstanden werden (3). Nach einem erweiterten Modell der NK-Zell-Education findet bei reifen NK-Zellen eine kontinuierliche, bidirektionale Anpassung („tuning“) der Responsivität statt (148). Während die übermäßige Stimulation durch aktivierende Signale zu einem negativen Tuning der NK-Zellen und damit zu Hyporesponsivität führt, geht die Steigerung des inhibitorischen Inputs mit einer verstärkten Responsivität einher. In diesem Sinn ist vorstellbar, dass erst der gesteigerte inhibitorische Input über NKG2A die NK-Zellen dazu „lizensiert“, auf stimulatorische Signale, vermittelt durch NKp46 und NKG2D, mit einer verstärkten zytotoxischen Antwort oder Zytokinproduktion zu reagieren.

Hinsichtlich der tatsächlichen Aktivität der NK-Zellen während der Schwangerschaft bei Gesunden produzierten verschiedene funktionelle Studienansätze variierende Ergebnisse. Die Erkenntnis, dass NK-Zellen von schwangeren Frauen verglichen mit nicht-schwangeren Frauen nach Stimulation mit Zytokinen oder Phorbolmyristatacetat (PMA) geringere Mengen von Zytokinen (z.B. INF- $\gamma$ ) produzierten (127, 149), führte zu der Annahme, dass die Schwangerschaft mit einer supprimierten NK-Zell-Antwort einhergehe. Ältere Untersuchungen mit dem Chromium Release Assay zeigten eine ebenfalls reduzierte zytotoxische Aktivität (131) oder aber, im Kontrast hierzu, eine erhaltene NK-Zytotoxizität in der späten Schwangerschaft (150). Neuere Studien führen diese Ergebnisse zu einem differenzierten Bild zusammen. Während NK-Zellen von Schwangeren nach PMA-Stimulation in der Tat eine geringere IFN- $\gamma$ -Produktion aufwiesen, verfügten diese im Kontakt mit Influenza-infizierten PBMCs sowohl über eine erhöhte IFN- $\gamma$ -Antwort als auch eine gesteigerte zytotoxische Aktivität (i.S. einer gesteigerten Expression des Degranulationsmarkers CD107a) (151). Die bereits beschriebene Studie von Le Gars et al. (147), die neben dem Phänotyp der NK-Zellen auch deren Funktion untersuchte, bestätigte diese Ergebnisse und zeigte, dass sowohl CD56<sup>bright</sup> als auch CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen von Schwangeren mehr Influenza-infizierte Monozyten und K562-Tumorzellen abtöten. Entgegen der ursprünglichen Annahme die NK-Zell-Aktivität unterläge einer

schwangerschafts-assoziierten Suppression, unterstreichen die letztgenannten Studien, dass NK-Zellen in Interaktion mit Zielzellen ein (sogar) gesteigertes Maß an zytotoxischer und zytokin-produzierender Aktivität während der Schwangerschaft aufweisen. Die Assoziation von gesteigerter NK-Zell-Aktivität und einem Phänotyp, der durch erhöhte Level von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren und Aktivierungsmarkern charakterisiert ist (147), deutet zudem auf eine potentielle molekulare Grundlage für diese funktionellen Veränderungen.

Der NK-Zell-Phänotyp in der Schwangerschaft bei MS ähnelt – unter Beachtung der begrenzten Datenlage – dem in der gesunden Schwangerschaft. Ob die erhöhte Expression der Rezeptoren NKp46 und NKG2A (sowie NKG2D auf den CD56<sup>bright</sup>) in ähnlicher Weise bei schwangeren MS-Patientinnen mit einer Verstärkung der NK-Zell-Aktivität einhergeht, lässt sich zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantworten. Bei rarem Zellmaterial in der hier untersuchten Kohorte wurden keine funktionellen Versuche durchgeführt. Auch liegen bisher generell keine funktionellen NK-Zell-Studien für den Kontext der Schwangerschaft bei MS vor. Doch diese Frage hat Relevanz für das Verständnis der Rolle der NK-Zellen in der MS-Pathogenese. Die peripheren NK-Zellen von nicht-schwangeren MS-Patientinnen und MS-Patienten zeigen zwar keine veränderte Expression von NKp46, NKG2D und NKG2A im Vergleich zu Gesunden (59, 60, 103), aber eine eingeschränkte Zytotoxizität, die mit Phasen von radiologischer und klinischer Krankheitsaktivität assoziiert wurde (52). Hiervon ist u.a. die Suppression von aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch NK-Zellen betroffen (60). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob sich der beobachtete NK-Zell-Phänotyp während der Schwangerschaft bei MS in eine Rekonstitution der gestörten NK-Zell-Zytotoxizität übersetzt und hierin womöglich ein Mechanismus der Protektion vor autoimmuner Aktivität besteht.

### 5.2.2 Bedeutung des CD56<sup>dim</sup> NK-Zell-Phänotyps

In erster Linie bestimmend für die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS war die generelle Reduktion ihrer Zellfrequenz. Innerhalb der insgesamt reduzierten CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen zeigte sich neben einer erhöhten Expression von NKp46 und NKG2A (Trend) ein erhöhter Anteil CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Zellen (siehe Kapitel 4.2.3). Die Zunahme der CD27-Expression bei erhaltener CX3CR1-Expression markiert den Übergang zu weniger reifen CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, wobei der CD27<sup>+</sup> Status von CD56<sup>dim</sup> und CD56<sup>bright</sup> mit einer geringeren zytotoxischen Kapazität aufgrund geringerer Perforin und Granzym B Level einhergeht (109). Allerdings machten die CD27<sup>+</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Zellen mit knapp 5% der CD56<sup>dim</sup> nur eine kleine Zellfraktion aus, sodass fraglich ist, ob hieran eine allgemeine Tendenz zur verminderten Reife der CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen abgelesen werden kann. Eine weitere Beobachtung der vorliegenden Arbeit, die Zunahme der CD127<sup>+</sup> CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen, ist insofern interessant, als dass Polymorphismen im Gen von IL-7R $\alpha$  (CD127) mit einem erhöhten MS-Risiko assoziiert wurden (114). Über die Bedeutung des

isolierten Anstiegs von IL-7R $\alpha$  auf den CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS – jedoch nicht auf CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die IL-7R $\alpha$  generell stärker exprimieren – lässt sich nur mutmaßen. Vor dem Hintergrund, dass die NK-Zellen von MS-Patienten eine erhöhte IL-7R $\alpha$ -Expression bei geringeren IL-7-Serumleveln aufweisen und nach IL-7-Stimulation im erhöhten Maß ihre Zytotoxizität steigern (115), sind Auswirkungen auf das zytotoxische Potential der CD56<sup>dim</sup> denkbar. Allerdings könnte eine verstärkte IL-7R $\alpha$ -Expression auch das Survival der CD56<sup>dim</sup> sichern (113, 115) und somit als reaktive Anpassung auf die generelle Reduktion der CD56<sup>dim</sup> Population während der Schwangerschaft erfolgen.

### 5.2.3 Bedeutung des CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Phänotyps

Der vorherrschende Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen während der Schwangerschaft bei MS deutet jedenfalls auf ein verstärktes zytotoxisches Potential. In zwei automatisierten Clustering-Verfahren (FlowSOM- und Citrus-Algorithmus) gelang jeweils unabhängig voneinander die Identifikation einer CD56<sup>bright</sup> Subpopulation mit einem CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp (siehe Kapitel 4.2.2). Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit diesem spezifischen Phänotyp nahmen hinsichtlich ihres Anteils innerhalb aller CD56<sup>bright</sup> bzw. aller CD56<sup>+</sup> NK-Zellen im Verlauf der Schwangerschaft zu, um im dritten Trimester die größte CD56<sup>bright</sup> Population zu bilden (siehe Citrus-Ergebnis). Ein Teil dieser Zellen wies mit einer CD27<sup>-</sup> CX3CR1<sup>+</sup> Expression zudem Merkmale besonders reifer NK-Zellen auf. In der Literatur wurden CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellen im Vergleich zu den CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>-</sup> als vollumfänglich kompetente zytotoxische Effektorzellen beschrieben. Sowohl mit Blick auf die durch CD16 (Fc $\gamma$ -Rezeptor-IIIa) vermittelte antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) als auch für die direkte Zytotoxizität zeigten die CD56<sup>bright</sup> CD16<sup>+</sup> eine erhöhte zytotoxische Aktivität vergleichbar mit der der CD56<sup>dim</sup> CD16<sup>+</sup> NK-Zellen (152). Somit kann spekuliert werden, dass die Schwangerschaft bei MS reifere, besonders responsive CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen mit einem erhöhten zytotoxischen Potential hervorbringt.

### 5.2.4 Neue Perspektiven auf die NK-Zell-vermittelte Immunregulation

In der vorliegenden Arbeit konnte somit nicht nur die relative Zunahme der gesamten CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population während der Schwangerschaft bei MS nachgewiesen werden, sondern diese auch mit der Expansion eines spezifischen, womöglich sehr responsiven, CD56<sup>bright</sup> Subsets in Verbindung gebracht werden. Im Allgemeinen werden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als regulatorische Zellen bezeichnet, weil sie die Immunantwort über die Sekretion von Zytokinen, aber auch durch die Suppression anderer Immunzellpopulationen beeinflussen (39). Doch was bedeutet *immunregulatorisch* mit Blick auf den hier nachgewiesenen CD56<sup>bright</sup> Phänotyp konkret? Wie könnten die expandierenden CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zur Kontrolle der MS-Krankheitsaktivität während der Schwangerschaft beitragen?

### *Suppression autoreaktiver T-Zellen*

Ein entscheidender Regulationsmechanismus könnte in der verstärkten Suppression autoreaktiver T-Zellen durch das expandierende CD56<sup>bright</sup> Subset liegen. Den NK-Zellen, insbesondere den CD56<sup>bright</sup>, wurde aufgrund ihrer Fähigkeit, aktivierte autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen mittels direkter Zytotoxizität abzutöten, eine wichtige Rolle in der Immunhomöostase und in der Limitation von Autoimmunität zugesprochen (22). Die hochpositiv exprimierten Moleküle des hier beobachteten schwangerschafts-assoziierten CD56<sup>bright</sup> Phänotyps sind dabei neben anderen Rezeptoren auf entscheidende Weise in die NK-T-Zell-Interaktion involviert (siehe Tabelle 1). So kann der NK-Zell-Rezeptor NKG2D bei Bindung der MHC Klasse I-assoziierten Moleküle MIC-A/B oder ULBP die Aktivierung und Degranulation von NK-Zellen gegenüber autologen T-Zellen vermitteln (11). Die NKG2D-Liganden repräsentieren klassische Zellstress-Signale, werden jedoch auch auf aktivierten T-Zellen hochreguliert, wodurch diese anfällig für die Zytolyse durch NK-Zellen werden. Auf diese Weise wird womöglich eine überschießende T-Zell-Aktivität vermieden (153). Der natürliche Zytotoxizitätsrezeptor NKp46 ist ebenfalls an der Induktion der NK-Zytotoxizität gegenüber T-Zellen beteiligt. Wird NKp46 z.B. mit einem spezifischen Antikörper *in vitro* maskiert, resultiert eine verstärkte Proliferation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, da die NK-Zellen die aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in geringerem Umfang abtöten (11, 59). Die NKp46-getriggert natürliche Zytotoxizität zeigte sich dabei Granzym B-abhängig (59). Welche NKp46-Liganden den Kontakt auf Seite der T-Zellen vermitteln, konnte bisher nicht geklärt werden (154); eine Hochregulierung während der T-Zell-Aktivierung analog zu den NKG2D-Liganden ist aber vorstellbar (59). Die Interaktion zwischen NKG2A und HLA-E bewirkt einen entgegengesetzten Effekt. Als Gegengewicht zu den aktivierenden Signalen regulieren T-Zellen bei Aktivierung auch ihre HLA-E Expression hoch, sodass die Ligation mit dem inhibierenden NK-Zell-Rezeptor NKG2A die Zytotoxizität der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen begrenzt (11). Die CD16-vermittelte antikörper-abhängige zelluläre NK-Zytotoxizität (ADCC) spielt für die Suppression autologer T-Zellen vermutlich keine Rolle. Allerdings markiert der CD16<sup>+</sup> Status wie bereits erwähnt reifere CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die neben der ADCC auch durch eine voll ausgeprägte direkte Zytotoxizität charakterisiert sind (siehe Kapitel 5.2.3).

Bei MS scheint ebendiese immunprotektive NK-T-Zell-Interaktion beeinträchtigt, was v.a. auf eine Evasion der T-Zellen vor NK-vermittelter Zytotoxizität und weniger auf einen NK-intrinsischen Defekt zurückgeführt wurde (siehe Kapitel 1.2.2). Pathogenetisch relevant könnte u.a. die gestörte Kommunikation über die DNAM-1/CD155-Achse sein (60). Im Kontext der Schwangerschaft bei MS wurde aber keine Veränderung der DNAM-Expression auf den NK-Zellen beobachtet (siehe Tabelle 15 und Tabelle 19). Die Expression der Rezeptoren NKp46 und NKG2D zeigte sich bei MS-Patienten im Vergleich mit gesunden Kontrollen unverändert (60, 103); ebenso die NKG2A-Expression. Allerdings wurde die geringe zytotoxische Kapazität der

CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gegenüber T-Zellen bei MS mit den erhöhten Leveln des NKG2A-Liganden HLA-E auf den peripheren CD4<sup>+</sup> T-Zellen der Patienten assoziiert (59). Durch Blockade der NKG2A-HLA-E Interaktion ließ sich die Zytotoxizität der NK-Zellen von MS-Patienten wiederherstellen (59) und die inflammatorische Aktivität im EAE-Modell reduzieren (45). Die Inhibition der NK-Zellen durch gesteigerte HLA-E Level könnte sich auch direkt im ZNS abspielen. Sowohl im Liquor von MS-Patienten (lösliche Form) als auch in MS-Läsionen, auf Endothelzellen und infiltrierenden Lymphozyten, wurde eine verstärkte HLA-E Expression nachgewiesen (65, 155, 156). Die Konsequenzen, die die aberrante HLA-E Expression bei MS für die NK-Zell-Funktion in der Schwangerschaft hat, sind schwer vorauszusagen. Die hier beobachtete Hochregulierung von NKG2A auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen könnte in Kombination mit einem erhöhten HLA-E Level zur verstärkten Inhibition dieser Zellen führen und somit im Widerspruch zu der Hypothese stehen, die Schwangerschaft bei MS begünstige die NK-Zell-vermittelte Suppression autoreaktiver T-Zell-Klone. Andererseits könnte der inhibitorische Input über NKG2A „im Konzert“ mit den aktivierenden Stimuli (NKp46, NKG2D) und im Zuge der NK-Zell-Education auch in einer verstärkten Responsivität der CD56<sup>bright</sup> resultieren (siehe Kapitel 5.2.1). Zudem ist fraglich, wie die HLA-E Expression durch die Schwangerschaft bei MS beeinflusst wird.

Abseits von den Vorgängen der Schwangerschaft verstärken verschiedene MS-Therapien (DMT) das NK-Zell-vermittelte zytotoxische Killing von T-Zellen, sodass die Wiederherstellung dieser regulatorischen NK-Zell-Funktion als potentieller Mechanismus der DMT-induzierten Krankheitskontrolle in Frage kommt. Den Prototypen in dieser Hinsicht bildete Daclizumab – ein gegen IL-2R $\alpha$  gerichteter monoklonaler Antikörper, der wesentlich zum Verständnis der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als regulatorisches Subset in der MS beigetragen hat, jedoch 2018 seine Zulassung aufgrund schwerwiegender therapieassoziierten Nebenwirkungen (u.a. Enzephalitiden) verlor (157). Daclizumab induziert eine ausgeprägte und selektive Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, die mit der Reduktion der Krankheitsaktivität unter Therapie korrelierte (Details siehe Kapitel 5.1.3). Den therapeutischen Effekt dieser Expansion führten Bielekova et al. (142) in ihrer wegweisenden Studie auf die NK-Zell-vermittelte Begrenzung des Survivals von aktivierten T-Zellen zurück, für die der direkte (potentiell zytotoxische) Kontakt zwischen NK- und T-Zellen notwendig war. Die Behandlung mit Daclizumab steigerte dabei im Vergleich zum Status vor der Therapie die gegen aktivierte T-Zellen gerichtete Zytotoxizität der NK-Zellen. Einen Hinweis dafür, dass dieser Mechanismus auch in vivo von Relevanz sein könnte, fanden Bielekova et al. (142) in der Korrelation zwischen CD56<sup>bright</sup> Expansion und Kontraktion der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut der behandelten Patienten. Im Folgenden bestätigten weitere Studien die Steigerung der NK-Zytotoxizität gegenüber autologen T-Zellen während der Therapie mit Daclizumab; zum einen vermittelt über Granzym K (61) und zum anderen durch die Wiederherstellung der bei MS gestörten DNAM-CD155-Interaktion (60). Auch der Einfluss von

Daclizumab auf den Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen wurde untersucht. Bielekova et al. zeigten, dass die erhöhte NK-Zytotoxizität gegen T-Zellen mit einem gesteigerten Expressionslevel für NKp46, NKG2D und NKG2A assoziiert war (142). Eine weitere Gruppe bestätigte die erhöhte Expression von NKG2A und von verschiedenen aktivierenden Rezeptoren auf den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, jedoch nicht für NKp46. Dieser Rezeptor war unter Einfluss von Daclizumab reduziert (158). In der letztgenannten Studie wurde zudem eine Erhöhung der zytotoxisch relevanten Moleküle CD16 und Perforin auf bzw. in den CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen beobachtet. Der Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen weist damit unter Einfluss von Daclizumab gewisse Ähnlichkeiten zum hier beobachteten, schwangerschafts-assoziierten Phänotyp der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auf (z.B. ein erhöhtes NKG2A).

Weitere Therapieansätze, zu denen ein Effekt auf die NK-T-Zell-Interaktion bei MS beschrieben wurde, sind Dimethylfumarat (DMF) und die in klinischen Studien untersuchte autologe Stammzelltransplantation (aHSCT). In der Therapie mit Dimethylfumarat wurde eine Zunahme der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nachgewiesen, die in Korrelation zur Reduktion von CD8<sup>+</sup> Memory T-Zellen stand (159). Die Autoren der Studie zeigten zudem, dass NK-Zellen von gesunden Kontrollen, die in vitro mit DMF und Monomethylfumarat (aktiver DMF-Metabolit) vorbehandelt wurden, in der Co-Kultur zwischen NK- und T-Zellen über eine verstärkte Zytotoxizität verfügten. Bei aggressiver, therapierefraktärer MS kann mittels aHSCT eine effektive Langzeitkontrolle der MS-Aktivität erreicht werden (160). In Untersuchungen zur Entwicklung des Immunsystems nach aHSCT bei MS zeigten die NK-Zellen eine rasche und vollständige Rekonstruktion ihrer Zellzahl und supprimierten Th17-Zellen nachhaltig mittels NKG2D-abhängiger Zytotoxizität (106). Als wichtige Immunregulatoren tragen NK-Zellen auf diese Weise dazu bei, dass die Re-Expansion pathogenetisch relevanter T-Zell-Populationen nach aHSCT unterdrückt werden kann.

Zusammenfassend lässt sich festhalten: NK-Zellen, insbesondere CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, kontrollieren die T-Zell-Antwort durch das Abtöten aktivierter T-Zellen – ein immunregulatorischer Mechanismus, der bei MS beeinträchtigt ist und dessen Wiederherstellung vermutlich zum therapeutischen Effekt verschiedener MS-Therapien beiträgt. Ausgehend von den phänotypischen Beobachtungen der vorliegenden Studie kann die Vermutung aufgestellt werden, dass das dominierende CD56<sup>bright</sup> Subset in der Schwangerschaft bei MS über eine geeignete Rezeptorausstattung verfügt, um autoreaktive T-Zell-Klone effektiv zu supprimieren und über diesen Mechanismus die Reduktion der entzündlichen MS-Aktivität zu begünstigen.

### *Shaping der dendritischen Zellen*

Das Shaping der dendritischen Zellen (DC) könnte einen weiteren Mechanismus darstellen, über den die hier nachgewiesenen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen ihren immunregulatorischen Einfluss in der Schwangerschaft ausüben. DCs tragen wesentlich zur Pathogenese der MS/EAE bei, indem sie

als antigen-präsentierende Zellen die Aktivierung von autoreaktiver Th1- und Th17-Zellen u.a. direkt im ZNS ermöglichen (161). NK-Zellen verfügen grundsätzlich über die Fähigkeit immature myeloide DCs (iDC) mittels direkter Zytotoxizität abzutöten und somit den Pool der reifenden DCs zu ‚editieren‘ (20). Diese physiologische Funktion wird v.a. durch den NCR NKp30, aber auch durch NKp46 vermittelt (162). Zudem war für eine effektive NK-Zytotoxizität gegen iDCs ein KIR<sup>-</sup>CD94/NKG2A<sup>+</sup> Rezeptorstatus notwendig (163), was auf eine vorherrschende Rolle der CD56<sup>bright</sup> deutet. Dass die NK-Zell-vermittelte Editierung der DCs auch im Kontext der MS von Relevanz sein könnte, darauf verweisen Erkenntnisse zum Wirkmechanismus des MS-Medikaments Glatirameracetat (GA) (104, 164). GA verstärkte demnach die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber den immaturren DCs sowie gegenüber den maturaen DCs, was v.a. auf eine erhöhte Suszeptibilität der DCs zurückgeführt wurde. Auch eine erhöhte Expression von NKp30, NKp46 und NKG2D auf den IL-2 aktivierten NK-Zellen wurde mit der gesteigerten NK-Zytotoxizität assoziiert (104). Ein Teil des therapeutischen Effekts von GA könnte sich somit daraus ableiten, dass NK-Zellen über die verstärkte Lyse der DCs die Antigenpräsentation gegenüber autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen und damit deren Aktivierung limitieren (104). Inwieweit die NK-Zellen auch während der Schwangerschaft bei MS DCs verstärkt abtöten und auf diese Weise die autoimmune T-Zell-Antwort beeinflussen, bleibt zu klären; der Phänotyp des dominierenden CD56<sup>bright</sup> Subsets der Schwangerschaft könnte jedoch als erster Hinweis verstanden werden.

### *Zytokinsekretion*

Nicht zuletzt könnte sich die immunregulatorische Rolle der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS über die Zytokinsekretion vermitteln. Ob die NK-Zellen die Immunantwort mit Blick auf die Autoimmunität in eine protektive oder destruktive Richtung beeinflussen, könnte maßgeblich davon abhängen, welches spezifische Profil an Zytokinen sie in dieser Phase produzieren. Bei nicht-schwangeren MS-Patientinnen und Patienten wurden NK-Zellen, die verstärkt das Typ2-Zytokin IL-5 produzierten, mit Phasen der MS-Remission assoziiert (54). Für die Schwangerschaft bei MS liegen bisher keine spezifischen Ergebnisse zur Zytokinproduktion der NK-Zellen vor; lediglich für die Gesamtheit der Lymphozyten des peripheren Blutes konnten Airas et al. eine erhöhte Ratio von Typ2-/Typ1-Zytokinen bei schwangeren MS-Patientinnen nachweisen (92). Untersuchungen der NK-Zellen von Gesunden zeigten zudem für die frühe Schwangerschaft einen Anstieg der IL-10-produzierenden NK-Zellen (165) und für das dritte Trimester einen erhöhten Anteil Typ2-Zytokin-produzierender ST2L<sup>+</sup> NK-Zellen (166). Mit Blick auf den Fokus der vorliegenden Arbeit stellt sich insbesondere die Frage, welche Auswirkungen der beobachtete NK-Zell-Phänotyp auf die Zytokinproduktion hat. Die Datenlage hierzu ist sehr gering und stützt sich lediglich auf korrelative Untersuchungen. Fukui et al. (167) beschrieben eine negative Assoziation zwischen dem Anteil der NKp46<sup>+</sup> NK-Zellen

und dem Anteil der Typ1-Zytokin (TNF $\alpha$ )-produzierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der gesunden Schwangerschaft und zogen die reduzierte NKp46-Expression von Präeklampsie-Patientinnen als mögliche Ursache für den Typ1-Zytokin Bias der Präeklampsie heran. In einer anderen Studie fand sich eine positive Korrelation zwischen den NKp46<sup>+</sup> NK-Zellen und den IL-4<sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup> CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen bei Frauen ohne vorherige Schwangerschaftskomplikationen (Material von nicht-schwangeren Frauen) (168). Alternativ könnte es jedoch auch sein, dass die gesteigerte NKp46-Expression die NK-Zellen zwar verstärkt aktiviert, letztlich jedoch die balancierte Zytokin-Produktion der antigen-präsentierenden Zellen (z.B. Gleichgewicht IL-12 und IL18) den Ausschlag dafür gibt, welchen Typ von Zytokinen die NK-Zellen während der Schwangerschaft produzieren (69).

### 5.2.5 Rolle der NK-Zellen in der Immunregulation auf Ebene des Organismus

Der Blick von Humanstudien zum maternalen Immunsystem in der Schwangerschaft ist häufig auf die Zellpopulationen des peripheren Blutes begrenzt; so auch im vorliegenden Projekt. Die eigentliche Immunregulation findet jedoch in den Geweben statt. Wie der hier beobachtete Phänotyp der zirkulierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen im Verhältnis zu den toleranz-induzierenden Vorgängen in utero und – vermutlich noch bedeutsamer für die Reduktion der MS-Aktivität – zu den Prozessen in den lymphatischen Geweben sowie im ZNS steht, kann somit nur vermutet werden.

Am besten untersucht ist die gewebespezifische Rolle der NK-Zellen während der Schwangerschaft in der Dezidua. Deziduale NK-Zellen (dNK) ähneln in ihrem CD56<sup>bright</sup> Phänotyp und der Expression aktivierender Rezeptoren (z.B. NKp46, NKG2D) den peripheren CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen, bilden darüber hinaus allerdings eine phänotypisch und funktionell einzigartige Population (169). Ausgestattet mit Adhäsionsmolekülen (z.B. CD49a) und KIR, jedoch CD16<sup>-</sup>, tragen sie durch die Sekretion von spezifischen Chemokinen v.a. zur Trophoblasteninfiltration und Neoangiogenese bei (170). Einen Beitrag zur Immunregulation leisten dNK indirekt, indem sie den immaturren Phänotyp der dezidualen DC-SIGN<sup>+</sup> DCs und deren Kapazität fördern, regulatorische T-Zellen zu induzieren (171).

Das immunregulatorische Netzwerk der Schwangerschaft erstreckt sich über den Uterus hinaus in die sekundären lymphatischen Gewebe (Review in (172)) und wird somit relevant für die systemische Immunität und Autoimmunität. Im Fokus der Vorgänge in den lymphatischen Geweben stand bisher v.a. die durch DCs induzierte T-Zell-Toleranz gegenüber den fetalen Antigenen, die über die Lymphe in die uterus-drainierenden Lymphknoten bzw. in Form von Syncytiotrophoblasten-Partikel in die maternale Zirkulation gelangen. Für die Toleranzinduktion ist ein immaturer DC-Phänotyp entscheidend. Zur Rolle der NK-Zellen (u.a. der zirkulierenden

CD56<sup>bright</sup>) in den SLTs scheinen bisher keine Erkenntnisse für die Schwangerschaft vorzuliegen. Vorstellbar wäre etwa eine ähnlich supportive Rolle wie im Uterus (171) oder aber die Suppression der Aktivierung von T-Zellen mit Reaktivität für fetale Antigene durch NK-Zell-Zytotoxizität.

Mit Blick auf die Fragestellung dieser Promotionsarbeit ist jedoch v.a. interessant, wie sich die Toleranzinduktion in den lymphatischen Geweben auf die autoimmune Aktivität der MS auswirkt. Nach der Hypothese der peripheren Aktivierung von autoreaktiven Immunzellen bilden die Lymphknoten einen zentralen Ort der MS-Pathogenese (26). Ob sich das regulatorische Netzwerk der Schwangerschaft bis in uterus-ferne Lymphknoten erstreckt, ist nicht geklärt. Geht man jedoch vorerst davon aus, sind verschiedene Mechanismen denkbar. Die beschriebene tolerogene DC-T-Zell-Interaktion könnte die autoimmune Aktivität etwa durch Copräsentation von fetalen Antigenen und Autoantigenen (172) oder durch eine sog. Bystander Suppression ausgehend von den induzierten alloantigen-spezifischen T<sub>reg</sub> (173) dämpfen. Außerdem könnte das tolerogene Milieu der Lymphknoten auch die immunregulatorischen Funktionen der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen gegenüber autoreaktiven Zellen stärken, wie sie in den vorherigen Abschnitten beschrieben wurden (z.B. zytotoxisches Abtöten autoreaktiver T-Zellen, DC-Editing, Zytokinproduktion). In der Tat zeigten die zirkulierenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen der schwangeren MS-Patientinnen im dritten Trimenon eine insgesamt erhöhte Expression des Chemokinrezeptors CCR7 (siehe Kapitel 4.2.1) und ein Teil der CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> CD56<sup>bright</sup> Zellen exprimierte CCR7 hochpositiv (siehe Kapitel 4.2.2), sodass die Migration in die peripheren Lymphknoten und eine suppressive Wirkung dieser Zellen dort möglich ist.

Einen weiteren Beitrag zur Reduktion der MS-Aktivität während der Schwangerschaft könnten die hier charakterisierten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen auch direkt im ZNS leisten. Studien zum regulatorischen Einfluss der CD56<sup>bright</sup> im ZNS bei nicht-schwangeren MS Patientinnen wurde bereits in der Einführung (Kapitel 1.2.2) thematisiert. Die hier beobachteten CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> CD56<sup>bright</sup> Zellen exprimieren zum Teil CX3CR1 – ein Chemokinrezeptor, der die Migration der Zellen ins ZNS vermitteln könnte. In der Folge könnte dieses spezifische CD56<sup>bright</sup> Subset regulatorisch auf die ZNS-Inflammation einwirken. Allerdings wurde die Relevanz dieses Chemokinrezeptors für die Migration über die Blut-Gehirn-Schranke bisher nur im EAE-Mausmodell beobachtet (43).

Als Fazit lässt sich festhalten: Die detaillierten Ergebnisse zum Phänotyp der NK-Zellen deuten auf einen Beitrag dieser Zellen zur Wiederherstellung der Immuntoleranz in der Schwangerschaft bei MS hin. Bisher wurde – auf Basis der Zunahme der als regulatorisch geltenden CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen – eine regulatorische Rolle der NK-Zellen in der Schwangerschaft angenommen. Anhand der neuen Ergebnisse lässt sich diese Annahme nun weiter ausdifferenzieren.

### 5.3 Postpartale Krankheitsaktivität und NK-Zell-Phänotyp

Die Perspektive auf die in vivo NK-Zell-Dynamik von Patientinnen mit MS, insbesondere während und nach einer Schwangerschaft, ist wie bereits erwähnt i.d.R. auf die Blutzirkulation limitiert. Zur Frage wie sich der beobachtete CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Phänotyp auf die entzündliche MS-Aktivität im ZNS auswirken könnte, wurden im vorherigen Kapitel 5.2.5 einige theoretische Überlegungen angestellt. Solchen Kausalfragen kann sich in Humanstudien nur durch korrelative Untersuchungen angenähert werden. Aufgrund der schwierigen Zugänglichkeit des ZNS im Menschen, stellt dabei die in der MRT ermittelte MS-Aktivität einen wichtigen Proxy zur Beurteilung der dortigen pathologischen Prozesse dar. Somit ist es von hohem Wert, dass in der hier untersuchten Kohorte zum ersten Mal Erkenntnisse zum NK-Zell-Phänotyp *und* zur radiologischen Krankheitsaktivität in der postpartalen Phase vorliegen.

Auf klinischer Ebene ist die postpartale Phase von einer reboundartigen Reaktivierung der MS geprägt (80, 81). Die Analyse der vom Studienzentrum NCRC bereitgestellten MRT-Daten (Anzahl und Volumen der T2-gewichteten Läsionen) ergab entsprechend eine Zunahme der entzündlichen MS-Aktivität in der postpartalen Phase (siehe Kapitel 4.3.2). Vom ersten zum sechsten Monat nach Entbindung nahm das Läsionsvolumen signifikant zu. Die Anzahl der Läsionen zeigte keine signifikanten Veränderungen. Anhand der MRT-Aufnahmen ließ sich die entzündliche Aktivität sehr sensitiv d.h. im subklinischen Bereich nachweisen. So konnte im Vergleich zu den klinischen Daten (postpartalen Schub bei einer Patientin) in der MRT bei sechs der sieben Patientinnen eine (zumeist geringe) Volumenzunahme der T2-Läsionen beobachtet werden.

Zwei Imaging-Studien analysierten ebenfalls die MS-Krankheitsaktivität im MRT in Bezug auf Schwangerschaft und postpartale Phase und kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Paavilainen et al. (174) konnten in einer Kohorte von 28 Patientinnen eine Zunahme in Anzahl und Volumen der T2-Läsionen innerhalb der ersten drei postpartalen Monate im Vergleich zum dritten Trimester der Schwangerschaft feststellen. Khalid et al. (175) verglichen das T1- und T2-Läsionsvolumen in den ersten drei Monaten nach Entbindung mit den entsprechenden Werten vor der Schwangerschaft und fanden in beiden Wichtungen ebenfalls eine Erhöhung der postpartalen Läsionslast. Trotz dessen die hier verwendeten Vergleichszeitpunkte von diesen Studien abweichen, lässt sich in Zusammenschau aller Ergebnisse für die postpartale Phase eine Zunahme der entzündlichen MS-Aktivität im MRT erkennen. Diese Entwicklung beginnt bereits früh nach der Entbindung und setzt sich wie hier beobachtet mindestens bis in den sechsten Monat postpartal fort. Allerdings bleibt der Einwand von Paavilainen et al. zu bedenken, inwieweit dieser Effekt v.a. von den spezifischen Vorgängen der postpartalen Phase verursacht wird oder vielmehr dem allgemeinen MS-Verlauf geschuldet ist (174).

Die steigende Läsionslast fällt postpartal mit einer substantiellen Reduktion der immunregulatorischen CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen zusammen. Aufgrund der geringen Fallzahl (n=7) musste auf eine Korrelationsanalyse verzichtet werden. Deskriptiv zeigten drei der vier Patientinnen mit der stärksten Abnahme der CD56<sup>bright</sup> Frequenz gleichzeitig auch den ausgeprägtesten Anstieg ihres Läsionsvolumens (siehe Kapitel 4.3.3). Hieraus lässt sich noch keine Assoziation dieser beiden Parameter ableiten; zur Bestätigung sind Studien mit höheren Fallzahlen notwendig. Allenfalls kann mit erheblicher Vorsicht spekuliert werden, dass die postpartale Zunahme der entzündlichen MS-Aktivität im Zusammenhang mit dem Wegfallen der regulatorischen Aktivität der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen nach der Schwangerschaft steht. Ein potentieller Einfluss der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in vivo würde dann denkbar.

## 5.4 Schlussfolgerung

Die Frage nach den *protektiv wirkenden* Mechanismen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen bildete den konzeptionellen Hintergrund der vorliegenden Arbeit. Konkret wurde der Immunphänotyp der NK-Zellen bei MS erschlossen. Die Beobachtung des Immunsystems in Phasen, die von einem raschen Wechsel zwischen autoimmuner Krankheitsaktivität und Remission gekennzeichnet sind, kann für die Identifikation protektiver Mechanismen sehr aufschlussreich sein. Die Schwangerschaft stellt ein solches Zeitfenster dar und wurde daher als Paradigma für eine endogen induzierte Immunregulation herangezogen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen erstmals *im Detail*: Die NK-Zellen von MS-Patientinnen nehmen während der Schwangerschaft (als Phase klinischer Inaktivität) einen regulatorischen Phänotyp an. Zum einen nahm der Anteil der gesamten CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Population zu; zum anderen stieg die Expression verschiedener NK-Rezeptoren mit Relevanz für Zellaktivierung und Zytotoxizität, was sich u.a. in der Expansion eines spezifischen CD56<sup>bright</sup> Subset mit CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp abbildete. Die postpartale Phase (als Phase klinischer Exazerbation) ist von einer gegenläufigen Entwicklung geprägt. Die CD56<sup>bright</sup> NK-Zell-Frequenz und die Rezeptorexpression nahmen ab, begleitet von einer Erhöhung der entzündlichen MS-Aktivität im MRT (grafisches Abstract in Abbildung 28).

### 5.4.1 Limitationen

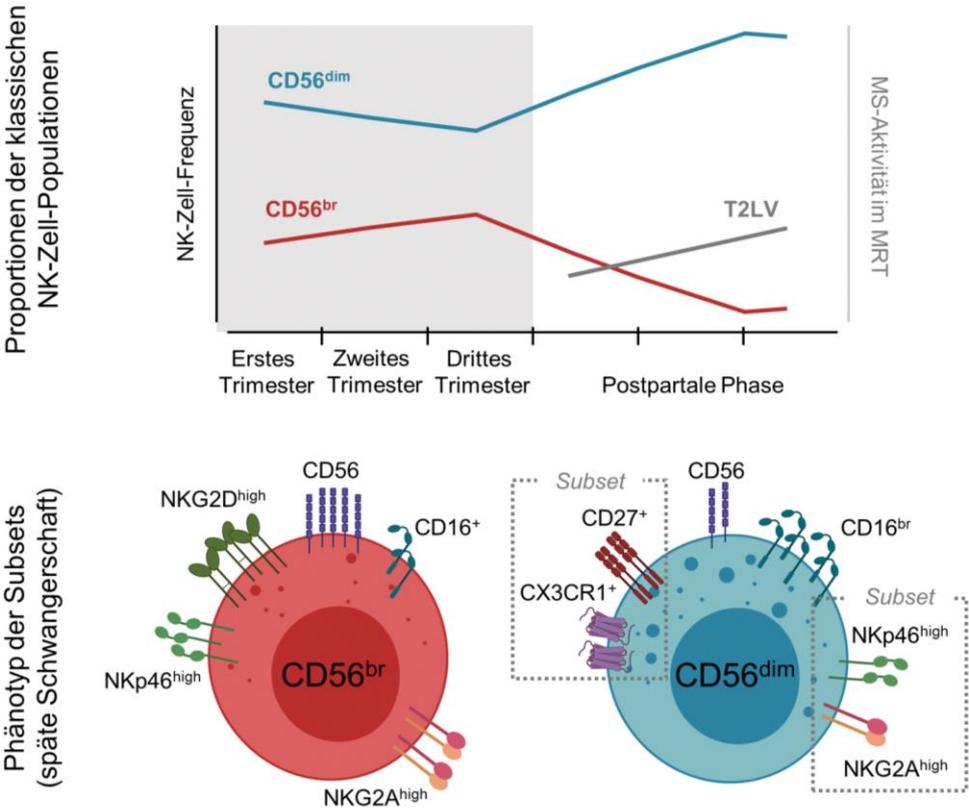
Allerdings muss auf verschiedene Limitationen dieser Arbeit hingewiesen werden. Allem voran wird die Aussagekraft durch den geringen Stichprobenumfang begrenzt, der zusätzlich durch die teils mangelnde Probequalität reduziert wurde. Die vorliegende Arbeit ist somit als explorative Studie zu verstehen (als solche wurde sie konzipiert), deren Ergebnisse einer weitergehenden Konfirmation in größeren Studien bedürfen. Dies betrifft insbesondere die Ergebnisse zur NK-

Zell-Rezeptorexpression sowie zur Assoziation zwischen NK-Zell-Phänotyp und Parametern der MS-Krankheitsaktivität – radiologisch wie klinisch. Grundsätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Prozess der Kryopreservation und des Auftauens der Proben die Komposition der NK-Zell-Subsets und die Rezeptorexpression beeinflusst hat. Das experimentelle Protokoll wurde jedoch entsprechend ausgerichtet und Messpunkte niedriger Qualität ausgeschlossen (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.4.3), um eine stabile Rezeptorexpression zu ermöglichen. Zudem sei darauf verwiesen, dass die Ergebnisse nur die relativen Veränderungen der NK-Zell-Populationen beschreiben. Informationen zur absoluten Zellzahl der NK-Zellen wären daher in weiteren Studien wünschenswert. Der hier beobachtete NK-Zell-Phänotyp ist das Ergebnis einer informierten Selektion von als relevant erachteten Markern. Recht wahrscheinlich sind aber weitere NK-Zell-Moleküle für die Funktion dieser Zellen in der Schwangerschaft ausschlaggebend. Eine noch umfassendere Exploration ließe sich mit den Mitteln der Massenzytometrie erreichen.

#### **5.4.2 Hypothesen für zukünftige Forschung**

Das Hauptziel von explorativen Studien ist es, Hypothesen für die zukünftige Forschung zu generieren. Aus den Ergebnissen zum NK-Zell-Phänotyp lassen sich verschiedene Annahmen zur Funktion und Rolle der NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS ableiten. *Erstens*, die Hochregulierung von NK-Zell-Rezeptoren, die Zellaktivierung vermitteln, erhöht die Responsivität der NK-Zellen und löst somit in Interaktion mit Zielzellen eine verstärkte zytotoxische bzw. zytokinproduzierende NK-Zell-Aktivität aus. *Zweitens*, die NK-Zellen weisen ein Mehr an regulatorischer Aktivität auf, indem sie a) die Aktivierung von autoreaktiven T-Zell-Klonen verstärkt zytotoxisch limitieren und/oder b) die Aktivität und den Phänotyp von antigen-präsentierenden dendritischen Zellen beeinflussen. *Drittens*, die verstärkte regulatorische NK-Zell-Aktivität trägt zur Reduktion der entzündlichen MS-Aktivität in der Schwangerschaft bei (protektive Wirkung). Um diese Hypothesen zu überprüfen, werden weitere Studien mit verschiedenen experimentellen Ansätzen benötigt.

### Ergebnisse der NK-Zell-Phänotypisierung



### Fokus der zukünftigen Forschung

Rolle der NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS

Konfirmatorisch	Expression der NK-Zell-Rezeptoren bestätigen Phänotyp und MS-Aktivität korrelieren
Funktionell <i>In vitro</i>	<i>Generell:</i> Aktivität der NK-Zellen bestimmen <i>Spezifisch:</i> Regulatorische Aktivität der NK-Zellen im Kontakt zu CD4 <sup>+</sup> T-Zellen und DCs bestimmen
Mechanistisch <i>In vivo</i>	Protective Rolle der NK-Zellen in der EAE eruieren (z.B. NK-Depletion, Rezeptor-Knockout)

**Abbildung 28. NK-Zell-Phänotyp in der Schwangerschaft bei MS.** Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu den **NK-Zell-Populationen** zeigen die Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen in der Schwangerschaft bei MS gefolgt von einer postpartalen Reduktion, die sich zeitgleich zur Zunahme der radiologischen MS-Aktivität ereignet. Die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen folgen einem inversen Muster. **Phänotyp der Subsets:** Die Zellfrequenz des abgebildete CD56<sup>bright</sup> Subsets mit CD16<sup>+</sup> NKp46<sup>high</sup> NKG2D<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Phänotyp sowie der zwei abgebildeten CD56<sup>dim</sup> Subsets nimmt im Verlauf der Schwangerschaft zu. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ein Bedarf für größere Studien (konfirmatorisch) sowie für funktionelle und mechanistische Studien ableiten. Detaillierte Erläuterung im Kapitel 5.4. Abkürzungen: Volumen der T2-gewichteten Läsionen im MRT (T2LV); dendritische Zellen (DCs); Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis (EAE). Grafik wurde erstellt mit Microsoft Power Point und Biorender.com.

Die vorliegende Arbeit ist auf die Ebene der Proteinexpression (Phänotyp) begrenzt; Aussagen zur tatsächlichen Zellfunktion können nicht getroffen werden. Hinsichtlich der ersten zwei Hypothesen bedarf es daher weiterer funktioneller Experimente. Die NK-Zell-Aktivität von schwangeren MS-Patientinnen lässt sich in vitro mittels intrazellulärer Färbung von Zytokinen nach Stimulation oder mittels CD107a-Degranulationsassay, bei dem die zytotoxische Aktivität gegenüber K-562 Tumorzellen getestet wird (176), beurteilen. Für jegliche funktionelle Tests werden idealerweise frisch isolierte PBMCs benötigt. Neuere Erkenntnisse zur T-Zell-Klonalität bei schwangeren MS-Patientinnen zeigen, dass die T-Zell-Klone, die für gewöhnlich das T-Zell-Repertoire der Patientinnen dominieren, in der Schwangerschaft herunterreguliert werden (91). Ob die hier beobachteten CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen oder aber auch das CD56<sup>dim</sup> Subset mit NKp46<sup>high</sup> NKG2A<sup>high</sup> Expression einen Einfluss auf diese T-Zell-Klone haben, ist eine spannende Frage. In einem ersten Schritt wäre es daher interessant, die spezifische NK-Zytotoxizität gegenüber autologen, aktivierten T-Zellen im Kontext der Schwangerschaft bei MS zu untersuchen. Experimentell kann dies in einer Co-Kultur aus NK und T-Zellen der Patientinnen mit CD107a-Degranulationsassay bzw. Proliferationsassay realisiert werden (wie in (60) bzw. (59) durchgeführt). Anhand maskierender Antikörper, die gegen die identifizierten NK-Zell-Rezeptoren NKp46, NKG2A und NKG2D gerichtet sind, ließe sich in diesem experimentellen Setting auch die Bedeutung der einzelnen NK-Zell-Moleküle überprüfen (vgl. (11)). Des Weiteren könnten sich in vitro Untersuchungen zum Einfluss der NK-Zellen auf die peripheren dendritischen Zellen in der Schwangerschaft bei MS lohnen. Hierbei wäre zum einen die Frage zu beantworten, ob die NK-Zellen von schwangeren MS-Patientinnen in NK-DC Co-Kultur eine verstärkte Zytotoxizität gegenüber immaturren und eventuell maturaen DCs aufweisen (vgl. (104)), da über diese zytotoxische Editierung der DCs die Aktivierung autoreaktiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen limitiert werden könnte. Zum anderen können NK-Zellen über ihre Zytokin-Sekretion einen immaturren DC-Phänotyp fördern, der in der Lage ist, regulatorische T-Zellen zu induzieren (siehe regulatorische NK-Zell-Funktion in utero (171)). Es wäre daher auch interessant, die in vitro Zytokin-Produktion der peripheren NK-Zellen im Kontakt zu den DCs zu messen (v.a. IL-10 und INF- $\gamma$ ).

Wirken die NK-Zellen auf Basis des beobachteten Phänotyps und einer möglicherweise gesteigerten regulatorischen Aktivität (dies gilt es noch zu überprüfen) in der Schwangerschaft *protektiv* vor entzündlicher MS-Aktivität? Die Forschung mit Menschen, insbesondere mit schwangeren Patientinnen wie in der vorliegenden Studie, bleibt auf korrelative Untersuchungen beschränkt; eine Aussage zu kausalen Wirkzusammenhängen kann nicht getroffen werden. Um die protektive Wirkung der hier identifizierten NK-Zellen und somit das mechanistische Verständnis im Sinne der dritten Hypothese zu überprüfen, müssen letztlich Studien in experimentellen Tiermodellen (etwa in der EAE) herangezogen werden. Auch im Tiermodell der MS, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), konnte eine Protektion vor

entzündlicher Krankheitsaktivität während der Schwangerschaft nachgewiesen werden (177, 178). Entsprechend könnte in Depletionsversuchen getestet werden, ob der durch die allogene Schwangerschaft vermittelte Schutz vor EAE-Aktivität bei kompletter Abwesenheit von NK-Zellen nach wie vor besteht oder aber aufgehoben wird. Letzteres würde für die protektive Rolle der NK-Zellen sprechen. Schwangerschaften sind in Mäusen trotz Abwesenheit von NK-Zellen erfolgreich (siehe Nullmutation im IL-15 Gen (76)). Allerdings ist zu beachten, dass EAE-Studien grundsätzlich (d.h. ohne Schwangerschaft) widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss der NK-Zellen lieferten, was auf unterschiedliche Depletionsverfahren zurückgeführt wurde (40). Spezifischer könnte zudem die in vivo Relevanz der NK-Zell-Rezeptoren Nkp46 (bzw. murines Ncr1) und NKG2D für die schwangerschafts-induzierte EAE-Protektion in entsprechenden Knockout-Mäusen untersucht werden (vgl. (179)). Mit Blick auf die Frage, welche Rolle die NK-Zellen für die Regulation der autoreaktiven Zellen im ZNS und in den lymphatischen Geweben während der Schwangerschaft spielen (siehe Kapitel 5.2.5), wäre es darüber hinaus notwendig, Wildtyp-Mäuse (schwanger und nicht-schwanger mit/ohne EAE-Induktion) vergleichend bezüglich der Verteilung der NK-Zellen in den Geweben sowie deren funktioneller Eigenschaften (z.B. Zytotoxizität in vitro) zu untersuchen. Hierbei sollten die murinen NK-Zell-Subsets, immature CD11b<sup>-</sup> CD27<sup>+</sup> und mature CD11b<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup> NK-Zellen, als Counterparts der humanen Subsets betrachtet werden (180).

Über die drei Hypothesen hinaus sei zuletzt nach den Ursachen der hier beobachteten NK-Zell-Dynamik gefragt. In der vorliegenden Arbeit wurden keine gesunden Schwangeren untersucht, dennoch lässt der Blick in die Literatur vermuten, dass sowohl die Expansion der CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen als auch die Hochregulierung der für die Zellaktivierung relevanten NK-Zell-Rezeptoren ein generelles Phänomen der gesunden Schwangerschaft darstellen (126, 147). Ob es sich hierbei um einen spezifischen regulatorischen Mechanismus mit evolutionärer Bedeutung oder um ein Epiphänomen weiter „downstream“ im immunregulatorischen Netzwerk der Schwangerschaft handelt, ist bisher nicht geklärt. Für Zweites sprechen die Beobachtungen, nach denen sowohl das Zytokinmilieu als auch die systemischen zirkulierenden Hormone die NK-Zellen beeinflussen (69, 181). Zudem führen wie bereits beschrieben verschiedene MS-Therapeutika zu ähnlichen Veränderungen im NK-Zell-Phänotyp. Somit könnten die CD56<sup>bright</sup> NK-Zellen v.a. als ein allgemeiner Marker für ein sich im immunregulatorischen Gleichgewicht befindliches Immunsystem aufgefasst werden.

Auf der anderen Seite sind die molekularen Treiber der Immunregulation in der plazentaren Schwangerschaft noch weitestgehend unbekannt. Neue Erkenntnisse beschreiben eine zeitliche Chronologie von Anpassungen im zellulären Signalling von Immunzellen im Sinne einer „immunologischen Uhr“ der Schwangerschaft (182). Die Veränderungen des NK-Zell-Phänotyps könnten somit das Resultat von zellulären Programmen sein, die die spezifischen Funktionen der

Zellen in der Schwangerschaft diktieren. In der genannten Studie wiesen NK-Zellen zum einen ein erhöhtes Niveau ihres basalen CREB-Signalling auf, einem Transkriptionsfaktor, der das Survival von Immunzellen unterstützt; zum anderen zeigten die CD56<sup>dim</sup> NK-Zellen ein gesteigertes STAT1-Signalling in Reaktion auf Typ I-Interferon IFN- $\alpha$ , was für die antivirale NK-Antwort bedeutsam ist (182). So wäre etwa vorstellbar, dass der NK-Zell-Phänotyp in der Schwangerschaft durch ein zelluläres Programm zustande kommt, das auf eine effektive Pathogenabwehr abzielt. Die gesteigerte Expression von NKp46, welches die NK-Zell-Antwort gegenüber dem Influenzavirus vermittelt (183), könnte Ausdruck eines solchen Programms sein. Weitere Studien zum intrazellulären Signalling sind jedoch notwendig, um die spezifischen Treiber für die Veränderung des NK-Zell-Phänotyps zu erschließen.

Die vorliegende Arbeit stellt einen weiteren Schritt hin zu einem besseren Verständnis der Protektion vor Autoimmunität in der Schwangerschaft und der Rolle der NK-Zellen in der MS-Pathogenese dar. NK-Zellen könnten in der Schwangerschaft das regulatorische Milieu (z.B. über Editierung der DCs) fördern und autoreaktive T-Zellen direkt supprimieren. Rolle und Funktion der NK-Zellen sind dabei nur mit Blick auf ihre Eingebundenheit in die Regulation der Immuntoleranz gegenüber dem Fetus und der Immunkompetenz gegenüber Pathogenen verständlich; im Nebeneffekt könnte sich die NK-Zell-Dynamik auch auf die Immunantwort gegenüber Autoantigenen auswirken. Ob es sich lohnt, den potentiell protektiven Einfluss der NK-Zellen außerhalb der Schwangerschaft, d.h. im Rahmen der MS-Therapie, nachzubilden, kann zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht beantwortet werden. Vorerst bedarf es weiterer funktioneller und mechanistischer Studien.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Murphy KM, Weaver C. Janeway's immunobiology. 9th ed. New York, London, Garland Science; 2017.
2. Vivier E, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, Koyasu S, Locksley RM, McKenzie ANJ, Mebius RE, Powrie F, Spits H. Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*. 2018;174(5):1054-66.
3. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science (New York, NY)*. 2011;331(6013):44-9.
4. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *European journal of immunology*. 1975;5(2):112-7.
5. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *International Journal of Cancer*. 1975;16(2):216-29.
6. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nature immunology*. 2008;9(5):503-10.
7. Freud AG, Mundy-Bosse BL, Yu J, Caligiuri MA. The Broad Spectrum of Human Natural Killer Cell Diversity. *Immunity*. 2017;47(5):820-33.
8. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology*. 2001;22(11):633-40.
9. Caligiuri MA. Human natural killer cells. *Blood*. 2008;112(3):461-9.
10. De Maria A, Bozzano F, Cantoni C, Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011;108(2):728-32.
11. Nielsen N, Odum N, Urso B, Lanier LL, Spee P. Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A. *PloS one*. 2012;7(2):e31959.
12. Smith SL, Kennedy PR, Stacey KB, Worboys JD, Yarwood A, Seo S, Solloa EH, Mistretta B, Chatterjee SS, Gunaratne P, Allette K, Wang YC, Smith ML, Sebra R, Mace EM, Horowitz A, Thomson W, Martin P, Eyre S, Davis DM. Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood advances*. 2020;4(7):1388-406.
13. Horowitz A, Strauss-Albee DM, Leipold M, Kubo J, Nemat-Gorgani N, Dogan OC, Dekker CL, Mackey S, Maecker H, Swan GE, Davis MM, Norman PJ, Guethlein LA, Desai M, Parham P, Blish CA. Genetic and Environmental Determinants of Human NK Cell Diversity Revealed by Mass Cytometry. *Science Translational Medicine*. 2013;5(208):208ra145-208ra145.
14. Melsen JE, Lugthart G, Lankester AC, Schilham MW. Human Circulating and Tissue-Resident CD56(bright) Natural Killer Cell Populations. *Front Immunol*. 2016;7:262.
15. Bryceson YT, March ME, Ljunggren H-G, Long EO. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunological reviews*. 2006;214(1):73-91.
16. Ljunggren H-G, Kärre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*. 1990;11:237-44.

17. Anfossi N, Andre P, Guia S, Falk CS, Roetyncck S, Stewart CA, Bresó V, Frassati C, Reviron D, Middleton D, Romagne F, Ugolini S, Vivier E. Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I. *Immunity*. 2006;25(2):331-42.
18. Jiang W, Li D, Han R, Zhang C, Jin WN, Wood K, Liu Q, Shi FD, Hao J. Acetylcholine-producing NK cells attenuate CNS inflammation via modulation of infiltrating monocytes/macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(30):E6202-e11.
19. Thorén FB, Riise RE, Ousbäck J, Della Chiesa M, Alsterholm M, Marcenaro E, Pesce S, Prato C, Cantoni C, Bylund J, Moretta L, Moretta A. Human NK Cells induce neutrophil apoptosis via an NKp46- and Fas-dependent mechanism. *J Immunol*. 2012;188(4):1668-74.
20. Moretta L, Ferlazzo G, Bottino C, Vitale M, Pende D, Mingari MC, Moretta A. Effector and regulatory events during natural killer–dendritic cell interactions. *Immunological reviews*. 2006;214(1):219-28.
21. Martin-Fontecha A, Thomsen LL, Brett S, Gerard C, Lipp M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nature immunology*. 2004;5(12):1260-5.
22. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Wiendl H, Marcenaro E, Kerlero de Rosbo N, Uccelli A, Laroni A. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2016;7:606.
23. Fehniger TA, Cooper MA, Nuovo GJ, Cella M, Facchetti F, Colonna M, Caligiuri MA. CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood*. 2003;101(8):3052-7.
24. Schleinitz N, Vély F, Harlé J-R, Vivier E. Natural killer cells in human autoimmune diseases. *Immunology*. 2010;131(4):451-8.
25. Yang Y, Day J, Souza-Fonseca Guimaraes F, Wicks IP, Louis C. Natural killer cells in inflammatory autoimmune diseases. *Clinical & Translational Immunology*. 2021;10(2):e1250.
26. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(9):545-58.
27. Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *The Lancet*. 2008;372(9648):1502-17.
28. Brownlee WJ, Hardy TA, Fazekas F, Miller DH. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *The Lancet*. 2017;389(10076):1336-46.
29. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Bang Oturai A, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BAC, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PIW, Debouverie M, D'hooghe MB, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SFA, Rosa Guerini F, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung H-P, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppä V, Liljedahl U, Lima Bomfim I, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen ÅR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero I-L, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr K-M, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Rückert I-M, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber

- S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PMA, Smestad C, Sørensen PS, Søndergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen A-M, Sundqvist E, Syvänen A-C, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CNA, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A, The International Multiple Sclerosis Genetics C, The Wellcome Trust Case Control C. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature*. 2011;476(7359):214-9.
30. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2016;13:25.
31. Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(8):594-604.
32. Voskuhl RR, Gold SM. Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression. *Nature Reviews Neurology*. 2012;8(5):255-63.
33. Reich DS, Lucchinetti CF, Calabresi PA. Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*. 2018;378(2):169-80.
34. Popescu BF, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. *Annual review of pathology*. 2012;7:185-217.
35. Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*. 2009;9(6):393-407.
36. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *The Lancet Neurology*. 2016;15(2):198-209.
37. Li R, Patterson KR, Bar-Or A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nature immunology*. 2018;19(7):696-707.
38. Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL. The innate immune system in demyelinating disease. *Immunological reviews*. 2012;248(1):170-87.
39. Chanvillard C, Jacolik RF, Infante-Duarte C, Nayak RC. The role of natural killer cells in multiple sclerosis and their therapeutic implications. *Front Immunol*. 2013;4:63.
40. Van Kaer L, Postoak JL, Wang C, Yang G, Wu L. Innate, innate-like and adaptive lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE. *Cellular & Molecular Immunology*. 2019;16(6):531-9.
41. Shi F-D, Takeda K, Akira S, Sarvetnick N, Ljunggren H-G. IL-18 Directs Autoreactive T Cells and Promotes Autodestruction in the Central Nervous System Via Induction of IFN- $\gamma$  by NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2000;165(6):3099-104.
42. Huang D, Shi F-D, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren H-G, Biron CA, Littman DR, Ransohoff RM. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *The FASEB Journal*. 2006;20(7):896-905.
43. Hertwig L, Hamann I, Romero-Suarez S, Millward JM, Pietrek R, Chanvillard C, Stuis H, Pollok K, Ransohoff RM, Cardona AE, Infante-Duarte C. CX3CR1-dependent recruitment of mature NK cells into the central nervous system contributes to control autoimmune neuroinflammation. *European journal of immunology*. 2016;46(8):1984-96.

44. Xu W, Fazekas G, Hara H, Tabira T. Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. 2005;163(1):24-30.
45. Leavenworth JW, Schellack C, Kim H-J, Lu L, Spee P, Cantor H. Analysis of the cellular mechanism underlying inhibition of EAE after treatment with anti-NKG2A F(ab')<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010;107(6):2562-7.
46. Morandi B, Bramanti P, Bonaccorsi I, Montalto E, Oliveri D, Pezzino G, Navarra M, Ferlazzo G. Role of natural killer cells in the pathogenesis and progression of multiple sclerosis. *Pharmacological Research*. 2008;57(1):1-5.
47. Liu Q, Sanai N, Jin W-N, La Cava A, Van Kaer L, Shi F-D. Neural stem cells sustain natural killer cells that dictate recovery from brain inflammation. *Nature Neuroscience*. 2016;19(2):243-52.
48. Morse RHA, Séguin R, McCrea EL, Antel JP. NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes. *Journal of neuroimmunology*. 2001;116(1):107-15.
49. Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, Cayrol R, Prat A, Hall JA, Arbour N. NKG2D-Mediated Cytotoxicity toward Oligodendrocytes Suggests a Mechanism for Tissue Injury in Multiple Sclerosis. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(5):1220-8.
50. Oger J, Kastrukoff LF, Li DK, Paty DW. Multiple sclerosis: in relapsing patients, immune functions vary with disease activity as assessed by MRI. *Neurology*. 1988;38(11):1739-44.
51. Kastrukoff LF, Morgan NG, Zecchini D, White R, Petkau AJ, Satoh J, Paty DW. A role for natural killer cells in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 1998;86(2):123-33.
52. Kastrukoff LF, Lau A, Wee R, Zecchini D, White R, Paty DW. Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity. *Journal of neuroimmunology*. 2003;145(1-2):103-14.
53. Takahashi K, Aranami T, Endoh M, Miyake S, Yamamura T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2004;127(Pt 9):1917-27.
54. Takahashi K, Miyake S, Kondo T, Terao K, Hatakenaka M, Hashimoto S, Yamamura T. Natural killer type 2 bias in remission of multiple sclerosis. *The Journal of clinical investigation*. 2001;107(5):R23-R9.
55. Michel T, Poli A, Cuapio A, Briquemont B, Iserentant G, Ollert M, Zimmer J. Human CD56bright NK Cells: An Update. *J Immunol*. 2016;196(7):2923-31.
56. De Jager PL, Rossin E, Pyne S, Tamayo P, Ottoboni L, Viglietta V, Weiner M, Soler D, Izmailova E, Faron-Yowe L, O'Brien C, Freeman S, Granados S, Parker A, Roubenoff R, Mesirov JP, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL. Cytometric profiling in multiple sclerosis uncovers patient population structure and a reduction of CD8low cells. *Brain : a journal of neurology*. 2008;131(Pt 7):1701-11.
57. Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, Prozorovski T, Pikol S, Hamann I, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Dorr J, Wuerfel J, Sturzebecher CS, Zipp F. Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2005;19(13):1902-4.
58. Lünemann A, Tackenberg B, DeAngelis T, da Silva RB, Messmer B, Vanoaica LD, Miller A, Apatoff B, Lublin FD, Lünemann JD, Münz C. Impaired IFN- $\gamma$  production and proliferation of NK cells in multiple sclerosis. *International immunology*. 2011;23(2):139-48.
59. Laroni A, Armentani E, Kerlero de Rosbo N, Ivaldi F, Marcenaro E, Sivori S, Gandhi R, Weiner HL, Moretta A, Mancardi GL, Uccelli A. Dysregulation of regulatory CD56(bright) NK cells/T cells interactions in multiple sclerosis. *J Autoimmun*. 2016;72:8-18.

60. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Runzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Herich S, Held K, Konjevic M, Hartwig M, Dornmair K, Hohlfeld R, Ziemssen T, Klotz L, Meuth SG, Wiendl H. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113(21):E2973-82.
61. Jiang W, Chai NR, Maric D, Bielekova B. Unexpected role for granzyme K in CD56bright NK cell-mediated immunoregulation of multiple sclerosis. *J Immunol*. 2011;187(2):781-90.
62. Morandi F, Horenstein AL, Chillemi A, Quarona V, Chiesa S, Imperatori A, Zanellato S, Mortara L, Gattorno M, Pistoia V, Malavasi F. CD56brightCD16- NK Cells Produce Adenosine through a CD38-Mediated Pathway and Act as Regulatory Cells Inhibiting Autologous CD4+ T Cell Proliferation. *J Immunol*. 2015;195(3):965-72.
63. Laroni A, Gandhi R, Beynon V, Weiner HL. IL-27 imparts immunoregulatory function to human NK cell subsets. *PloS one*. 2011;6(10):e26173.
64. Hamann I, Dorr J, Glumm R, Chanvillard C, Janssen A, Millward JM, Paul F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C. Characterization of natural killer cells in paired CSF and blood samples during neuroinflammation. *Journal of neuroimmunology*. 2013;254(1-2):165-9.
65. Morandi F, Venturi C, Rizzo R, Castellazzi M, Baldi E, Caniatti ML, Tola MR, Granieri E, Fainardi E, Uccelli A, Pistoia V. Intrathecal soluble HLA-E correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis and may cooperate with soluble HLA-G in the resolution of neuroinflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2013;8(4):944-55.
66. Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*. 1953;172(4379):603-6.
67. Mor G, Cardenas I. The immune system in pregnancy: a unique complexity. *Am J Reprod Immunol*. 2010;63(6):425-33.
68. Erlebacher A. Mechanisms of T cell tolerance towards the allogeneic fetus. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(1):23-33.
69. Sargent IL, Borzychowski AM, Redman CW. NK cells and human pregnancy--an inflammatory view. *Trends Immunol*. 2006;27(9):399-404.
70. Erlebacher A. Immunology of the Maternal-Fetal Interface. *Annual Review of Immunology*. 2013;31(1):387-411.
71. Moon JM, Capra JA, Abbot P, Rokas A. Immune Regulation in Eutherian Pregnancy: Live Birth Coevolved with Novel Immune Genes and Gene Regulation. *BioEssays*. 2019;41(9):1900072.
72. Kourtis AP, Read JS, Jamieson DJ. Pregnancy and Infection. *New England Journal of Medicine*. 2014;370(23):2211-8.
73. Munoz-Suano A, Hamilton AB, Betz AG. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunological reviews*. 2011;241(1):20-38.
74. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(9):656-63.
75. Hanna J, Goldman-Wohl D, Hamani Y, Avraham I, Greenfield C, Natanson-Yaron S, Prus D, Cohen-Daniel L, Arnon TI, Manaster I, Gazit R, Yutkin V, Benharroch D, Porgador A, Keshet E, Yagel S, Mandelboim O. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nature Medicine*. 2006;12(9):1065-74.

76. Barber EM, Pollard JW. The Uterine NK Cell Population Requires IL-15 but These Cells Are Not Required for Pregnancy nor the Resolution of a *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology*. 2003;171(1):37-46.
77. Mjosberg J, Berg G, Jenmalm MC, Ernerudh J. FOXP3+ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biology of reproduction*. 2010;82(4):698-705.
78. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology*. 2004;5(3):266-71.
79. Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA. A gender gap in autoimmunity. *Science (New York, NY)*. 1999;283(5406):1277-8.
80. Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. *Pregnancy in Multiple Sclerosis Group*. *The New England journal of medicine*. 1998;339(5):285-91.
81. Finkelsztejn A, Brooks JB, Paschoal FM, Jr., Fragoso YD. What can we really tell women with multiple sclerosis regarding pregnancy? A systematic review and meta-analysis of the literature. *BJOG*. 2011;118(7):790-7.
82. Patas K, Engler JB, Friese MA, Gold SM. Pregnancy and multiple sclerosis: fetomaternal immune cross talk and its implications for disease activity. *J Reprod Immunol*. 2013;97(1):140-6.
83. Gold SM, Voskuhl RR. Pregnancy and multiple sclerosis: from molecular mechanisms to clinical application. *Seminars in Immunopathology*. 2016;38(6):709-18.
84. Chaouat G. The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Seminars in Immunopathology*. 2007;29(2):95-113.
85. Ramien C, Taenzer A, Lupu A, Heckmann N, Engler JB, Patas K, Friese MA, Gold SM. Sex effects on inflammatory and neurodegenerative processes in multiple sclerosis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2016;67:137-46.
86. Voskuhl RR, Wang H, Wu TC, Sicotte NL, Nakamura K, Kurth F, Itoh N, Bardens J, Bernard JT, Corboy JR, Cross AH, Dhib-Jalbut S, Ford CC, Frohman EM, Giesser B, Jacobs D, Kasper LH, Lynch S, Parry G, Racke MK, Reder AT, Rose J, Wingerchuk DM, MacKenzie-Graham AJ, Arnold DL, Tseng CH, Elashoff R. Estriol combined with glatiramer acetate for women with relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet Neurology*. 2016;15(1):35-46.
87. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology*. 2004;112(1):38-43.
88. Mjosberg J, Svensson J, Johansson E, Hellstrom L, Casas R, Jenmalm MC, Boij R, Matthiesen L, Jonsson JI, Berg G, Ernerudh J. Systemic reduction of functionally suppressive CD4dimCD25highFoxp3+ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol. *J Immunol*. 2009;183(1):759-69.
89. Mjosberg J, Berg G, Ernerudh J, Ekerfelt C. CD4+ CD25+ regulatory T cells in human pregnancy: development of a Treg-MLC-ELISPOT suppression assay and indications of paternal specific Tregs. *Immunology*. 2007;120(4):456-66.
90. Munoz-Suano A, Kallikourdis M, Sarris M, Betz AG. Regulatory T cells protect from autoimmune arthritis during pregnancy. *J Autoimmun*. 2012;38(2-3):J103-8.
91. Ramien C, Yusko EC, Engler JB, Gamradt S, Patas K, Schweingruber N, Willing A, Rosenkranz SC, Diemert A, Harrison A, Vignali M, Sanders C, Robins HS, Tolosa E, Heesen C, Arck PC, Scheffold A, Chan K, Emerson RO, Friese MA, Gold SM. T Cell Repertoire Dynamics during Pregnancy in Multiple Sclerosis. *Cell Reports*. 2019;29(4):810-5.e4.

92. Airas L, Saraste M, Rinta S, Elovaara I, Huang YH, Wiendl H, Finnish Multiple S, Pregnancy Study G. Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. *Clin Exp Immunol.* 2008;151(2):235-43.
93. Saraste M, Vaisanen S, Alanen A, Airas L. Clinical and immunologic evaluation of women with multiple sclerosis during and after pregnancy. *Gender medicine.* 2007;4(1):45-55.
94. Spadaro M, Martire S, Marozio L, Mastromauro D, Montanari E, Perga S, Montarolo F, Brescia F, Balbo A, Botta G, Benedetto C, Bertolotto A. Immunomodulatory Effect of Pregnancy on Leukocyte Populations in Patients With Multiple Sclerosis: A Comparison of Peripheral Blood and Decidual Placental Tissue. *Front Immunol.* 2019;10:1935.
95. de Andrés C, Fernández-Paredes L, Tejera-Alhambra M, Alonso B, Ramos-Medina R, Sánchez-Ramón S. Activation of Blood CD3+CD56+CD8+ T Cells during Pregnancy and Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology.* 2017;8(196).
96. Schmidt P, Gaser C, Arsic M, Buck D, Förchler A, Berthele A, Hoshi M, Ilg R, Schmid VJ, Zimmer C, Hemmer B, Mühlau M. An automated tool for detection of FLAIR-hyperintense white-matter lesions in Multiple Sclerosis. *NeuroImage.* 2012;59(4):3774-83.
97. Yushkevich PA, Piven J, Hazlett HC, Smith RG, Ho S, Gee JC, Gerig G. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *NeuroImage.* 2006;31(3):1116-28.
98. Givan AL. Flow Cytometry: An Introduction. In: Hawley TS, Hawley RG, editors. *Flow Cytometry Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2011. p. 1-29.
99. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Andra I, Annunziato F, Bacher P, Barnaba V, Battistini L, Bauer WM, Baumgart S, Becher B, Beisker W, Berek C, Blanco A, Borsellino G, Boulais PE, Brinkman RR, Buscher M, Busch DH, Bushnell TP, Cao X, Cavani A, Chattopadhyay PK, Cheng Q, Chow S, Clerici M, Cooke A, Cosma A, Cosmi L, Cumano A, Dang VD, Davies D, De Biasi S, Del Zotto G, Della Bella S, Dellabona P, Deniz G, Dessing M, Diefenbach A, Di Santo J, Dieli F, Dolf A, Donnenberg VS, Dorner T, Ehrhardt GRA, Endl E, Engel P, Engelhardt B, Esser C, Everts B, Falk CS, Fehniger TA, Filby A, Fillatreau S, Follo M, Forster I, Foster J, Foulds GA, Frenette PS, Galbraith D, Garbi N, Garcia-Godoy MD, Ghoreschi K, Gibellini L, Goettlinger C, Goodyear CS, Gori A, Grogan J, Gross M, Grutzkau A, Grummitt D, Hahn J, Hammer Q, Hauser AE, Haviland DL, Hedley D, Herrera G, Herrmann M, Hiepe F, Holland T, Hombrink P, Houston JP, Hoyer BF, Huang B, Hunter CA, Iannone A, Jack HM, Javega B, Jonjic S, Juelke K, Jung S, Kaiser T, Kalina T, Keller B, Khan S, Kienhofer D, Kroneis T, Kunkel D, Kurts C, Kvistborg P, Lannigan J, Lantz O, Larbi A, LeibundGut-Landmann S, Leipold MD, Levings MK, Litwin V, Liu Y, Lohoff M, Lombardi G, Lopez L, Lovett-Racke A, Lubberts E, Ludewig B, Lugli E, Maecker HT, Martrus G, Matarese G, Maueroeder C, McGrath M, McInnes I, Mei HE, Melchers F, Melzer S, Mielenz D, Mills K, Mjosberg J, Moore J, Moran B, Moretta A, Moretta L, Mosmann TR, Muller S, Muller W, Munz C, Multhoff G, Munoz LE, Murphy KM, Nakayama T, Nasi M, Neudorfl C, Nolan J, Nourshargh S, O'Connor JE, Ouyang W, Oxenius A, Palankar R, Panse I, Peterson P, Peth C, Petriz J, Phillips D, Pickl W, Piconese S, Pinti M, Pockley AG, Podolska MJ, Pucillo C, Quataert SA, Radstake T, Rajwa B, Rebhahn JA, Recktenwald D, Remmerswaal EBM, Rezvani K, Rico LG, Robinson JP, Romagnani C, Rubartelli A, Ruland J, Sakaguchi S, Sala-de-Oyanguren F, Samstag Y, Sanderson S, Sawitzki B, Scheffold A, Schiemann M, Schildberg F, Schimisky E, Schmid SA, Schmitt S, Schober K, Schuler T, Schulz AR, Schumacher T, Scotta C, Shankey TV, Shemer A, Simon AK, Spidlen J, Stall AM, Stark R, Stehle C, Stein M, Steinmetz T, Stockinger H, Takahama Y, Tarnok A, Tian Z, Toldi G, Tornack J, Traggiai E, Trotter J, Ulrich H, van der Braber M, van Lier RAW, Veldhoen M, Vento-Asturias S, Vieira P, Voehringer D, Volk HD, von Volkman K, Waisman A, Walker R, Ward MD, Warnatz K, Warth S, Watson JV, Watzl C, Wegener L, Wiedemann A, Wienands J, Willmsky G, Wing J, Wurst P, Yu L, Yue A, Zhang Q, Zhao Y, Ziegler S, Zimmermann J. Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *European journal of immunology.* 2017;47(10):1584-797.
100. Montaldo E, Del Zotto G, Della Chiesa M, Mingari MC, Moretta A, De Maria A, Moretta L. Human NK cell receptors/markers: a tool to analyze NK cell development, subsets and function. *Cytometry A.* 2013;83(8):702-13.

101. Schlums H, Cichocki F, Tesi B, Theorell J, Beziat V, Holmes TD, Han H, Chiang SC, Foley B, Mattsson K, Larsson S, Schaffer M, Malmberg KJ, Ljunggren HG, Miller JS, Bryceson YT. Cytomegalovirus infection drives adaptive epigenetic diversification of NK cells with altered signaling and effector function. *Immunity*. 2015;42(3):443-56.
102. Martinez-Rodriguez JE, Cobo-Calvo A, Villar LM, Munteis E, Blanco Y, Rasal R, Vera A, Muntasell A, Alvarez-Lafuente R, Saiz A, Alvarez-Cermeno JC, Martinez-Yelamos S, Roquer J, Lopez-Botet M. Adaptive natural killer cell response to cytomegalovirus and disability progression in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*. 2016;22(6):741-52.
103. Durrenberger PF, Ettore A, Kamel F, Webb LV, Sim M, Nicholas RS, Malik O, Reynolds R, Boyton RJ, Altmann DM. Innate immunity in multiple sclerosis white matter lesions: expression of natural cytotoxicity triggering receptor 1 (NCR1). *Journal of neuroinflammation*. 2012;9:1.
104. Hoglund RA, Holmoy T, Harbo HF, Maghazachi AA. A one year follow-up study of natural killer and dendritic cells activities in multiple sclerosis patients receiving glatiramer acetate (GA). *PloS one*. 2013;8(4):e62237.
105. Raulet DH, Guerra N. Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):568-80.
106. Darlington PJ, Stopnicki B, Touil T, Doucet JS, Fawaz L, Roberts ME, Boivin MN, Arbour N, Freedman MS, Atkins HL, Bar-Or A. Natural Killer Cells Regulate Th17 Cells After Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Relapsing Remitting Multiple Sclerosis. *Front Immunol*. 2018;9:834.
107. Bottino C, Castriconi R, Pende D, Rivera P, Nanni M, Carnemolla B, Cantoni C, Grassi J, Marcenaro S, Reymond N, Vitale M, Moretta L, Lopez M, Moretta A. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *The Journal of experimental medicine*. 2003;198(4):557-67.
108. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, Stevens HE, Walker NM, Healy B, Howson JM, Maisuria M, Duley S, Coleman G, Gough SC, Worthington J, Kuchroo VK, Wicker LS, Todd JA. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes and immunity*. 2009;10(1):5-10.
109. Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM, Baars PA, Gent MR, Leclercq G, Hamann J, Kuijpers TW, van Lier RA. CD27 defines phenotypically and functionally different human NK cell subsets. *J Immunol*. 2008;180(6):3739-45.
110. Hamann I, Unterwalder N, Cardona AE, Meisel C, Zipp F, Ransohoff RM, Infante-Duarte C. Analyses of phenotypic and functional characteristics of CX3CR1-expressing natural killer cells. *Immunology*. 2011;133(1):62-73.
111. Pesce S, Moretta L, Moretta A, Marcenaro E. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. *Front Immunol*. 2016;7:414.
112. Johnson TA, Evans BL, Durafourt BA, Blain M, Lapierre Y, Bar-Or A, Antel JP. Reduction of the peripheral blood CD56(bright) NK lymphocyte subset in FTY720-treated multiple sclerosis patients. *J Immunol*. 2011;187(1):570-9.
113. Michaud A, Dardari R, Charrier E, Cordeiro P, Herblot S, Duval M. IL-7 enhances survival of human CD56bright NK cells. *Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997)*. 2010;33(4):382-90.
114. Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A, Caillier SJ, Ban M, Goris A, Barcellos LF, Lincoln R, McCauley JL, Sawcer SJ, Compston DA, Dubois B, Hauser SL, Garcia-Blanco MA, Pericak-Vance MA, Haines JL. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nature genetics*. 2007;39(9):1083-91.

115. Su N, Shi SX, Zhu X, Borazanci A, Shi FD, Gan Y. Interleukin-7 expression and its effect on natural killer cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*. 2014;276(1-2):180-6.
116. Telford WG, Babin SA, Khorev SV, Rowe SH. Green fiber lasers: An alternative to traditional DPSS green lasers for flow cytometry. *Cytometry Part A*. 2009;75A(12):1031-9.
117. Saeys Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nature Reviews Immunology*. 2016;16(7):449-62.
118. Van Gassen S, Callebaut B, Van Helden MJ, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, Saeys Y. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry Part A*. 2015;87(7):636-45.
119. Bruggner RV, Bodenmiller B, Dill DL, Tibshirani RJ, Nolan GP. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(26):E2770-E7.
120. Lenhard W, Lenhard A. Berechnung von Effektstärken. 2016 <https://www.psychometrica.de/effektstaerke.html>.
121. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. 2nd ed. Hillsdale, Erlbaum; 1988.
122. Bender R, Lange S, Ziegler A. Multiples Testen. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2007;132 Suppl 1:e26-9.
123. Simoni Y, Fehlings M, Kloverpris HN, McGovern N, Koo SL, Loh CY, Lim S, Kurioka A, Fergusson JR, Tang CL, Kam MH, Dennis K, Lim TK, Fui AC, Hoong CW, Chan JK, Curotto de Lafaille M, Narayanan S, Baig S, Shabeer M, Toh SE, Tan HK, Anicete R, Tan EH, Takano A, Klenerman P, Leslie A, Tan DS, Tan IB, Ginhoux F, Newell EW. Human Innate Lymphoid Cell Subsets Possess Tissue-Type Based Heterogeneity in Phenotype and Frequency. *Immunity*. 2017;46(1):148-61.
124. Stuppel A, Singerman D, Celi LA. The reproducibility crisis in the age of digital medicine. *npj Digital Medicine*. 2019;2(1):2.
125. Burke SD, Seaward AVC, Ramshaw H, Smith GN, Virani S, Croy BA, Lima PDA. Homing Receptor Expression Is Deviated on CD56+ Blood Lymphocytes during Pregnancy in Type 1 Diabetic Women. *PloS one*. 2015;10(3):e0119526.
126. Groen B, van der Wijk AE, van den Berg PP, Lefrandt JD, van den Berg G, Sollie KM, de Vos P, Links TP, Faas MM. Immunological Adaptations to Pregnancy in Women with Type 1 Diabetes. *Sci Rep*. 2015;5:13618.
127. Kraus TA, Engel SM, Sperling RS, Kellerman L, Lo Y, Wallenstein S, Escribese MM, Garrido JL, Singh T, Loubeau M, Moran TM. Characterizing the Pregnancy Immune Phenotype: Results of the Viral Immunity and Pregnancy (VIP) Study. *Journal of Clinical Immunology*. 2012;32(2):300-11.
128. Kwak-Kim J, Gilman-Sachs A. REVIEW ARTICLE: Clinical Implication of Natural Killer Cells and Reproduction. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2008;59(5):388-400.
129. Perricone R, Muzio GD, Perricone C, Giacomelli R, Nardo DD, Fontana L, Carolis CD. High Levels of Peripheral Blood NK Cells in Women Suffering from Recurrent Spontaneous Abortion are Reverted from High-Dose Intravenous Immunoglobulins. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2006;55(3):232-9.
130. Martínez-García EA, Sánchez-Hernández PE, Chavez-Robles B, Nuñez-Atahualpa L, Martín-Márquez BT, Arana-Argaez VE, García-Iglesias T, González-López L, Gamez-Nava JI, Petri MH, Velazquez-Rodriguez J, Salazar-Paramo M, Davalos-Rodriguez IP, Daneri-Navarro A, Vázquez-Del Mercado M. The Distribution of CD56dimCD16+ and CD56brightCD16- Cells are Associated with Prolactin Levels during Pregnancy and Menstrual Cycle in Healthy Women. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2011;65(4):433-7.

131. Hidaka Y, Amino N, Iwatani Y, Kaneda T, Mitsuda N, Morimoto Y, Tanizawa O, Miyai K. Changes in natural killer cell activity in normal pregnant and postpartum women: increases in the first trimester and postpartum period and decrease in late pregnancy. *J Reprod Immunol*. 1991;20(1):73-83.
132. Gregory CD, Lee H, Rees GB, Scott IV, Shah LP, Golding PR. Natural killer cells in normal pregnancy: analysis using monoclonal antibodies and single-cell cytotoxicity assays. *Clinical and experimental immunology*. 1985;62(1):121-7.
133. Kühnert M, Strohmeier R, Stegmüller M, Halberstadt E. Changes in lymphocyte subsets during normal pregnancy. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 1998;76(2):147-51.
134. Saraste M, Irijala H, Airas L. Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*. 2007;28(3):121-6.
135. Emmer PM, Nelen WLDM, Steegers EAP, Hendriks JCM, Veerhoek M, Joosten I. Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56posCD16pos cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Human Reproduction*. 2000;15(5):1163-9.
136. Twig G, Shina A, Amital H, Shoenfeld Y. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2012;38(2):J275-J81.
137. Samstein Robert M, Josefowicz Steven Z, Arvey A, Treuting Piper M, Rudensky Alexander Y. Extrathymic Generation of Regulatory T Cells in Placental Mammals Mitigates Maternal-Fetal Conflict. *Cell*. 2012;150(1):29-38.
138. Martinez-Rodriguez JE, Lopez-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, Comabella M. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)*. 2011;141(3):348-56.
139. Medina S, Villarrubia N, Sainz de la Maza S, Lifante J, Costa-Frossard L, Roldán E, Picón C, Álvarez-Cermeño JC, Villar LM. Optimal response to dimethyl fumarate associates in MS with a shift from an inflammatory to a tolerogenic blood cell profile. *Multiple Sclerosis Journal*. 2017;24(10):1317-27.
140. Gross CC, Ahmetspahic D, Ruck T, Schulte-Mecklenbeck A, Schwarte K, Jörgens S, Scheu S, Windhagen S, Graefe B, Melzer N, Klotz L, Arolt V, Wiendl H, Meuth SG, Alferink J. Alemtuzumab treatment alters circulating innate immune cells in multiple sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2016;3(6):e289.
141. Laroni A, Uccelli A. CD56bright Natural Killer Cells: A Possible Biomarker of Different Treatments in Multiple Sclerosis. *Journal of clinical medicine*. 2020;9(5).
142. Bielekova B, Catalfamo M, Reichert-Scriver S, Packer A, Cerna M, Waldmann TA, McFarland H, Henkart PA, Martin R. Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(15):5941-6.
143. Wynn D, Kaufman M, Montalban X, Vollmer T, Simon J, Elkins J, O'Neill G, Neyer L, Sheridan J, Wang C, Fong A, Rose JW. Daclizumab in active relapsing multiple sclerosis (CHOICE study): a phase 2, randomised, double-blind, placebo-controlled, add-on trial with interferon beta. *The Lancet Neurology*. 2010;9(4):381-90.
144. Bielekova B, Richert N, Herman ML, Ohayon J, Waldmann TA, McFarland H, Martin R, Blevins G. Intrathecal effects of daclizumab treatment of multiple sclerosis. *Neurology*. 2011;77(21):1877-86.
145. Martin JF, Perry JSA, Jakhete NR, Wang X, Bielekova B. An IL-2 Paradox: Blocking CD25 on T Cells Induces IL-2-Driven Activation of CD56<sup>bright</sup> NK Cells. *The Journal of Immunology*. 2010;185(2):1311-20.

146. Elkins J, Sheridan J, Amaravadi L, Riester K, Selmaj K, Bielekova B, Parr E, Giovannoni G. CD56bright natural killer cells and response to daclizumab HYP in relapsing-remitting MS. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2015;2(2):e65.
147. Le Gars M, Seiler C, Kay AW, Bayless NL, Starosvetsky E, Moore L, Shen-Orr SS, Aziz N, Khatri P, Dekker CL, Swan GE, Davis MM, Holmes S, Blish CA. Pregnancy-Induced Alterations in NK Cell Phenotype and Function. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(2469).
148. Brodin P, Kärre K, Höglund P. NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends in Immunology*. 2009;30(4):143-9.
149. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Bouman A, Moes H, Heineman M-J, de Leij LFMH, Santema J, Faas MM. Cytokine production in natural killer cells and lymphocytes in pregnant women compared with women in the follicular phase of the ovarian cycle. *Fertility and sterility*. 2002;77(5):1032-7.
150. Gregory CD, Lee H, Scott IV, Golding PR. Phenotypic heterogeneity and recycling capacity of natural killer cells in normal human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 1987;11(2):135-45.
151. Kay AW, Fukuyama J, Aziz N, Dekker CL, Mackey S, Swan GE, Davis MM, Holmes S, Blish CA. Enhanced natural killer-cell and T-cell responses to influenza A virus during pregnancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(40):14506-11.
152. Béziat V, Duffy D, Quoc SN, Le Garff-Tavernier M, Decocq J, Combadière B, Debré P, Vieillard V. CD56bright CD16+ NK Cells: A Functional Intermediate Stage of NK Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*. 2011;186(12):6753-61.
153. Cerboni C, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood*. 2007;110(2):606-15.
154. Sivori S, Carlomagno S, Pesce S, Moretta A, Vitale M, Marcenaro E. TLR/NCR/KIR: Which One to Use and When? *Frontiers in Immunology*. 2014;5(105).
155. Pannemans K, Broux B, Goris A, Dubois B, Broekmans T, Van Wijmeersch B, Geraghty D, Stinissen P, Hellings N. HLA-E restricted CD8+ T cell subsets are phenotypically altered in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal*. 2013;20(7):790-801.
156. Durrenberger PF, Webb LV, Sim MJW, Nicholas RS, Altmann DM, Boyton RJ. Increased HLA-E expression in white matter lesions in multiple sclerosis. *Immunology*. 2012;137(4):317-25.
157. Bianchi A, Ciccarelli O. Daclizumab-induced encephalitis in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*. 2019;25(12):1557-9.
158. Ranganath T, Simpson LJ, Ferreira A-M, Seiler C, Vendrame E, Zhao N, Fontenot JD, Holmes S, Blish CA. Characterization of the Impact of Daclizumab Beta on Circulating Natural Killer Cells by Mass Cytometry. *Frontiers in Immunology*. 2020;11(714).
159. Smith MD, Calabresi PA, Bhargava P. Dimethyl fumarate treatment alters NK cell function in multiple sclerosis. *European journal of immunology*. 2018;48(2):380-3.
160. Muraro PA, Martin R, Mancardi GL, Nicholas R, Sormani MP, Saccardi R. Autologous haematopoietic stem cell transplantation for treatment of multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*. 2017;13(7):391-405.
161. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nature immunology*. 2007;8(2):172-80.
162. Spaggiari GM, Carosio R, Pende D, Marcenaro S, Rivera P, Zocchi MR, Moretta L, Poggi A. NK cell-mediated lysis of autologous antigen-presenting cells is triggered by the engagement of the

phosphatidylinositol 3-kinase upon ligation of the natural cytotoxicity receptors NKp30 and NKp46. *European journal of immunology*. 2001;31(6):1656-65.

163. Della Chiesa M, Vitale M, Carlomagno S, Ferlazzo G, Moretta L, Moretta A. The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors. *European journal of immunology*. 2003;33(6):1657-66.

164. Sand KL, Knudsen E, Rolin J, Al-Falahi Y, Maghazachi AA. Modulation of natural killer cell cytotoxicity and cytokine release by the drug glatiramer acetate. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2009;66(8):1446-56.

165. Shigeru S, Akitoshi N, Subaru M-H, Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *Journal of Reproductive Immunology*. 2008;77(1):14-22.

166. Borzychowski AM, Croy BA, Chan WL, Redman CW, Sargent IL. Changes in systemic type 1 and type 2 immunity in normal pregnancy and pre-eclampsia may be mediated by natural killer cells. *European journal of immunology*. 2005;35(10):3054-63.

167. Fukui A, Yokota M, Funamizu A, Nakamura R, Fukuhara R, Yamada K, Kimura H, Fukuyama A, Kamoi M, Tanaka K, Mizunuma H. Changes of NK Cells in Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology*. 2012;67(4):278-86.

168. Fukui A, Ntrivalas E, Fukuhara R, Fujii S, Mizunuma H, Gilman-Sachs A, Beaman K, Kwak-Kim J. Correlation between natural cytotoxicity receptors and intracellular cytokine expression of peripheral blood NK cells in women with recurrent pregnancy losses and implantation failures. *Am J Reprod Immunol*. 2009;62(6):371-80.

169. Vacca P, Moretta L, Moretta A, Mingari MC. Origin, phenotype and function of human natural killer cells in pregnancy. *Trends in Immunology*. 2011;32(11):517-23.

170. Cristiani CM, Palella E, Sottile R, Talerico R, Garofalo C, Carbone E. Human NK Cell Subsets in Pregnancy and Disease: Toward a New Biological Complexity. *Front Immunol*. 2016;7:656.

171. Leno-Durán E, Muñoz-Fernández R, García Olivares E, Tirado-González I. Liaison between natural killer cells and dendritic cells in human gestation. *Cellular & Molecular Immunology*. 2014;11(5):449-55.

172. Taglauer ES, Adams Waldorf KM, Petroff MG. The hidden maternal-fetal interface: events involving the lymphoid organs in maternal-fetal tolerance. *Int J Dev Biol*. 2010;54(2-3):421-30.

173. Kahn DA, Baltimore D. Pregnancy induces a fetal antigen-specific maternal T regulatory cell response that contributes to tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010;107(20):9299-304.

174. Paavilainen T, Kurki T, Parkkola R, Färkkilä M, Salonen O, Dastidar P, Elovaara I, Airas L. Magnetic resonance imaging of the brain used to detect early post-partum activation of multiple sclerosis. *European Journal of Neurology*. 2007;14(11):1216-21.

175. Khalid F, Healy BC, Dupuy SL, Chu R, Chitnis T, Bakshi R, Houtchens M. Quantitative MRI analysis of cerebral lesions and atrophy in post-partum patients with multiple sclerosis. *Journal of the neurological sciences*. 2018;392:94-9.

176. Tomescu C, Chehimi J, Maino VC, Montaner LJ. Retention of viability, cytotoxicity, and response to IL-2, IL-15, or IFN-alpha by human NK cells after CD107a degranulation. *Journal of leukocyte biology*. 2009;85(5):871-6.

177. Engler JB, Heckmann NF, Jäger J, Gold SM, Friese MA. Pregnancy Enables Expansion of Disease-Specific Regulatory T Cells in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*. 2019;203(7):1743-52.

178. Gatson NN, Williams JL, Powell ND, McClain MA, Hennon TR, Robbins PD, Whitacre CC. Induction of pregnancy during established EAE halts progression of CNS autoimmune injury via pregnancy-specific serum factors. *Journal of neuroimmunology*. 2011;230(1-2):105-13.
179. Glasner A, Zurunic A, Meninger T, Lenac Rovis T, Tsukerman P, Bar-On Y, Yamin R, Meyers AFA, Mandelboim M, Jonjic S, Mandelboim O. Elucidating the Mechanisms of Influenza Virus Recognition by Ncr1. *PLoS one*. 2012;7(5):e36837.
180. Crinier A, Milpied P, Escalière B, Piperoglou C, Galluso J, Balsamo A, Spinelli L, Cervera-Marzal I, Ebbo M, Girard-Madoux M, Jaeger S, Bollon E, Hamed S, Hardwigsen J, Ugolini S, Vély F, Narni-Mancinelli E, Vivier E. High-Dimensional Single-Cell Analysis Identifies Organ-Specific Signatures and Conserved NK Cell Subsets in Humans and Mice. *Immunity*. 2018;49(5):971-86.e5.
181. Robinson DP, Klein SL. Pregnancy and pregnancy-associated hormones alter immune responses and disease pathogenesis. *Hormones and behavior*. 2012;62(3):263-71.
182. Aghaeepour N, Ganio EA, McIlwain D, Tsai AS, Tingle M, Van Gassen S, Gaudilliere DK, Baca Q, McNeil L, Okada R, Ghaemi MS, Furman D, Wong RJ, Winn VD, Druzin ML, El-Sayed YY, Quintance C, Gibbs R, Darmstadt GL, Shaw GM, Stevenson DK, Tibshirani R, Nolan GP, Lewis DB, Angst MS, Gaudilliere B. An immune clock of human pregnancy. *Science Immunology*. 2017;2(15):eaan2946.
183. Mandelboim O, Lieberman N, Lev M, Paul L, Arnon TI, Bushkin Y, Davis DM, Strominger JL, Yewdell JW, Porgador A. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature*. 2001;409(6823):1055-60.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Anne Wisgalla, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Schwangerschaftsbezogene Veränderungen des NK-Zell-Phänotyps bei Multipler Sklerose“ („Pregnancy-related Alterations of NK Cell Phenotype in Multiple Sclerosis“) selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

17. Januar 2022

Unterschrift

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen danken, die mich während der Promotion unterstützt und begleitet haben.

Zuallererst gilt mein herzlicher Dank meinem Erstbetreuer Prof. Stefan Gold für die Bereitstellung des überaus interessanten Themas und seine tatkräftige Betreuung über den gesamten Prozess der Erstellung dieser Arbeit. Die klärenden und strukturierenden Diskussionen mit ihm haben den Rahmen gebildet, in dem ich das wissenschaftliche Arbeiten fundiert erlernen konnte. Die thematische Vielfalt seiner Publikationen hat mir als Orientierung und Inspiration gedient.

Auch bei meiner Zweitbetreuerin Prof. Carmen Infante Duarte möchte ich mich herzlich für die hilfreichen Gespräche während der Laborphase meiner Arbeit bedanken. Die kollaborative Atmosphäre in ihrer Arbeitsgruppe, von der ich ein Teil sein konnte, stellte einen wichtigen, unterstützenden Faktor in meinem Promotionsvorhaben dar.

Für die wertvollen Ratschläge zur korrekten Verwendung der Durchflusszytometrie danke ich Mathias Streitz vielmals. Diese waren wesentlich für die Qualität der erzeugten Daten und haben mich darüber hinaus nachhaltig für die doch recht komplexe Methode Durchflusszytometrie begeistert. Dr. Stephan Schlickeiser danke ich zudem für die begleitende bioinformatische Beratung. Mein Dank richte ich außerdem an Prof. Friedemann Paul und die Mitglieder der AG Klinische Neuroimmunologie am NeuroCure Clinical Research Center für die Bereitstellung des Probenmaterials sowie der klinischen und radiologischen Daten.

Bei allen Mitgliedern der AG Gold und AG Infante-Duarte bedanke ich mich für die überaus produktive Zusammenarbeit. Insbesondere möchte ich Daniel Brunotte-Strecker, Silvina Romero Suárez, Juliana Campo Garcia, Svenja Schwichtenberg und Stefanie Gamradt danken, die mich bei Schwierigkeiten und Erfolgen in der Laborarbeit begleitet haben.

Prof. Joerg Hasford und Katharina Krüger vom Arbeitskreis Medizinischer Ethik-Kommissionen danke ich für die Flexibilität, die den berufsbegleitenden Abschluss der Promotion ermöglicht hat.

Ganz besonders danke ich meinen Freundinnen und Freunden Lisa, Paulien, Jeanette, Silvina Lissi, Johanna und Patrick für ihre wertvolle Unterstützung während der Schreibphase, die mir sehr viel bedeutet hat. Den Korrekturleserinnen unter ihnen möchte ich zusätzlich für diese mühevollen Arbeit danken.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Kerstin und Torsten sowie meinem Bruder Tim für eure unermessliche Unterstützung, ohne die meine Promotion schlicht nicht möglich gewesen wäre. Ihr habt wie niemand anderes die Grundlagen für mein Denken und Handeln geprägt, dafür bin ich euch sehr dankbar.