

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Operative Intensivmedizin und Schmerzmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim

Direktorin: Prof. Dr. med. Grietje Beck
Lehrstuhl: Prof. Dr. med. Manfred Thiel

Untersuchung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber
Thymus- und Lebertumorzellen: Einfluss der Chemotherapie
und Etablierung eines 3D-Sphäroidmodells

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des Doctor scientiarum humanarum
(Dr. sc. hum.)
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Susanne Christine Kleiner
aus
Mainz
2025

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerdts
Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. physiol. Holger Lindner

Für meine Familie-
in tiefer Dankbarkeit und Liebe

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG.....	4
1.1 Die Bedeutung Natürlicher Killerzellen in der Immunabwehr	4
1.1.1 Das Immunsystem	4
1.1.2 Natürliche Killerzellen: Überblick und Charakterisierung.....	6
1.2 PVR /CD155 als Immuncheckpoint in der Tumorbilogie	9
1.2.1 PVR: Struktur und Signalkaskaden.....	9
1.2.2 Aufgaben, Wirkung und Bindungspartner von PVR	10
1.3 Tumorerkrankungen und Immuntherapeutische Ansätze in der Onkologie.....	12
1.3.1 Immuntherapeutische Einsätze von NK-Zellen beim Kampf gegen Krebs.....	13
1.3.2 Charakterisierung der Eingesetzten Zelllinien.....	15
1.4 Molekulare Mechanismen des Zelltods: Grundlagen und Signalwege.....	19
1.4.1 Apoptose und ihre Bedeutung in physiologischen und pathologischen Prozessen	19
1.4.2 Molekulare Mechanismen von Parthanatos: Die Rolle von PARP-1-Aktivierung und AIF-Translokation bei der nicht- apoptotischen Zellzerstörung	22
1.5 Verwendete Chemotherapeutika und ihre Wirkung auf den Körper: Cisplatin, Etoposid und Olaparib.....	23
1.6 Das drei-dimensionale Tumormodell: Tumorsphäroide mit ihren Chancen und Herausforderungen.....	25
2 FRAGESTELLUNG	29

3 MATERIAL UND METHODEN.....	30
3.1 Material	30
3.1.1 Allgemeine Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software und Reagenzien	30
3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Zelllinien für die Zellkultur	32
3.1.3 Materialien und Antikörper für die Durchflusszytometrie	34
3.1.4 Materialien zur Reinigung der NK-Zellen mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung	35
3.1.5 Reagenzien und Materialien zur Messung von Viabilität/Zytotoxizität und Caspase- Aktivität.....	35
3.1.6 Magnetic Bead Array.....	36
3.1.7 Allgemeine Puffer und Lösungen	36
3.2 Methoden.....	37
3.2.1 Zellkultur adhärenter Zellen	37
3.2.2 Passagierung der Zellen	37
3.2.3 Bestimmung der Viabilität, Zellgröße und Zellzahl	38
3.2.4 Auftauen, sowie das Einfrieren von adhärenen Zellen	38
3.2.5 3D Zellkultur: Sphäroidformation.....	39
3.2.6 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) über Dichtegradientenzentrifugation	39
3.2.7 Hypotone Lyse der Erythrozyten	40
3.2.8 Magnetische Aufreinigung von Natürlichen Killerzellen.....	40
3.2.9 Koinkubationsversuche in 2D.....	41
3.2.10 Vielfarben Durchflusszytometrie.....	42
3.2.11 Durchflusszytometrische Charakterisierung von NK- und Tumorzellen: Vorversuche und Gating-Strategie	43
3.2.12 Durchflusszytometrische Analyse der metabolischen Aktivität: GLUT-1-Färbung.....	44
3.2.13 Durchflusszytometrische Viabilitäts- und Zytotoxizitätsanalyse: 7-AAD/ AnnexinV-Färbung.....	45
3.2.14 Durchflusszytometrische Degranulationsanalysen mit CD107a	47
3.2.15 Durchflusszytometrische Analysen der Zytotoxizität: Vorversuch Chemotherapeutika in 2D	48
3.2.16 Durchflusszytometrische Analysen der PVR-Expression auf Tumorzellen	50

3.2.17	Durchflusszytometrische Analysen der Zytotoxizität des PARP-Inhibitors Olaparib	54
3.2.18	Durchflusszytometrie: Einstellungen und Auswertung der Daten	55
3.2.19	Bestimmung der zelllinien-spezifischen Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Etoposid und Cisplatin (Chemotherapie Positivkontrolle)	56
3.2.20	ApoTox-Glo™ Triplex Assay	57
3.2.21	CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	58
3.2.22	Multiplex Assay	59
3.2.23	Statistische Auswertungen	61
4	ERGEBNISSE	62
4.1	2D-Versuche der Koinkubation von Tumorzelllinien und NK-Zellen	62
4.1.1	Zunahme der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität nach Koinkubation mit Tumorzellen	62
4.1.2	Vergleichbare Effekte von Low-Glucose-kultivierten TY82-Zellen und High-Glucose-Tumorzellen nach Koinkubation	66
4.1.3	Degranulationsanalysen zeigen einen signifikanten Unterschied nach Koinkubation	68
4.1.4	GLUT-1 Expression steigt während der Koinkubation von NK-Zellen und der Tumorzelllinie TY82 signifikant an	69
4.1.5	Analyse der Zytotoxizität von NK-Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika und anschließender Koinkubation	70
4.1.6	Der PARP-Inhibitor Olaparib und seine Wirkung auf die Zytotoxizität in der Koinkubation mit NK-Zellen	77
4.1.7	Quantifizierung der Proteinkonzentrationen im Überstand nach Olaparib-Behandlung und Koinkubation zeigt signifikante Erhöhung von Granzym A, Granzym B und GM-CSF	87
4.1.8	Der Poliovirus Rezeptor und seine Expression während der Koinkubation	91
4.2	Etablierung von 3D-Modellen zur Untersuchung der Wirkung von Chemotherapie-Substanzen	96

5 DISKUSSION	108
5.1 Analyse von Apoptose und Zytotoxizität durch NK-Zellen im 2D-Tumormodell	108
5.2 Chemotherapeutische Behandlung und ihr Einfluss auf die Interaktion zwischen NK- und Tumorzellen in Koinkubation	110
5.3 Interaktion zwischen Parthanatos und Immunantwort: Die Rolle von Olaparib in der Tumor- und NK-Zell-Koinkubation	112
5.4 Immunmodulation und Zellstress unter Low-Glucose-Bedingungen: Einfluss auf die Tumorzellen und NK-Zell-Aktivität	115
5.5 PVR-abhängige Modulation der NK-Zell-Effektorfunktion in der Koinkubation mit Tumorzellen.....	116
5.6 Etablierung von 3D-Tumormodellen mit den Tumorzelllinien TY82 und HepG2	119
 6 ZUSAMMENFASSUNG.....	 122
 7 LITERATURVERZEICHNIS.....	 124
 8 ANHANG.....	 147
 9 LEBENS LAUF	 151
 10 DANKSAGUNG.....	 152

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
7-AAD	7-Aminoactinomycin
AIF	Apoptose induzierender Faktor (Apoptosis-Inducing Factor)
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosintriphosphat
B-Zelle	B-Lymphozyt
C°	Grad Celsius
Ca ²⁺	Kalzium
CD	Differenzierungsantigen (cluster of differentiation)
cDNA	Komplementäre DNA (complementary DNA)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAM-1	DNAX Accessory Molecule-1
ECM	Extrazelluläre Matrix (extracellular matrix)
EDTA	Ethyldiamintetraazetat
FACS	Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
g	g-Beschleunigung
GLUT	Glukosetransporter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
H ₂ O	Wasser
HG	Hohe Glukoserate (High Glucose)
HIF 1α	Hypoxie-erzeugender Faktor 1α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha)
HLA-Klasse-I Moleküle	Humanes Leukozyten Antigen-Klasse-I-Molekül
IAP	Inhibitor of apoptosis protein
IFN-γ	Interferon-Gamma
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif

ITT	immunoglobulin tyrosine tail
KIR	Killerzellen-Immunglobulin-ähnlicher Rezeptor (Killer cell immunoglobuline like receptor)
LAMP	Schleifen-vermittelte isothermale Amplifikation (loop-mediated isothermal amplification)
LG	Niedrige Glukoserate (Low Glucose)
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
MACS	Magnetisches Trennverfahren (Magnetic-activated cell sorting)
MeFI	Mediane Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MIF	Makrophagen-Migrations-Inhibitions-Faktor (Macrophage migration inhibitory factor)
Min	Minute
mL	Milliliter
mM	Millimolar
mTOR	Ziel des Rapamycin im Säugetier (Mammalian target of rapamycin complex)
n	Stichprobenumfang
ng	nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
O ₂	Sauerstoff
PAMPs	Pathogen-assoziierte molekulare Muster (Mammalian target of rapamycin complex)
PARP-1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1
PBMCs	Periphere mononukleäre Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Antibiotika Penicillin/Streptavidin
PerCP	Peridin-Chlorophyll-Protein
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PVR	Polivirus Rezeptor
RFU	Relative Fluoreszenzeinheiten
RLU	Relative Lichteinheit
RNA	Ribolukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species)
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI Medium	Am <u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute entwickeltes Medium
RT	Raumtemperatur

SD	Standardabweichung
sek.	Sekunde
SSC	Seitwärtsstreulicht (Side scatter)
St.	Stunde
T	Tumorzelle
T-Zelle	T-Lymphozyt
TET	Thymusepitheltumore (Thymic epithelial Tumors)
TIGIT	T-Zell-Immunrezeptor mit Ig- und ITIM-Domänen (T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains)
TNF-Rezeptoren	Tumornekrosefaktor-Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
μL	Mikroliter
μM	Mikromolar

1 EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung Natürlicher Killerzellen in der Immunabwehr

1.1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein hochkomplexes Abwehrsystem zum Schutz gegen Krankheitserreger, Toxinen, Pathogenen und entarteter Zellen. Der Kontakt mit Bakterien, Viren und anderen Pathogenen ist unvermeidbar, da sie eingeatmet oder mit der Nahrung aufgenommen werden. Die erste große Barriere gegen Erreger aller Art stellen anatomische Barrieren wie beispielsweise die Haut und die Schleimhäute dar (Murphy et al., 2009; Rink et al., 2015). Gelingt es einem Pathogen diese Barriere zu überwinden, treten die nächsten Abwehrmechanismen des Körpers in Kraft mit dem Ziel, die Erregerlast im Körper zu verringern, langfristig zu eliminieren und einer erneuten Infektion vorzubeugen. Dabei muss das Immunsystem sicherstellen, dass die Reaktionen ausschließlich gegen körperfremde oder entartete Zellen stattfinden und körpereigene Zellen verschont bleiben (Murphy et al., 2009).

Das Immunsystem des menschlichen Körpers kann in das angeborene unspezifische und das erworbene (adaptive) spezifische Immunsystem unterteilt werden (Hoffmann et al., 1999). Beide stehen in enger Wechselwirkung, unterscheiden sich jedoch prinzipiell in ihrer Funktionsweise und ihrem zeitlichen Ablauf. Das angeborene Immunsystem zeichnet sich durch eine rasche, innerhalb von Minuten bis Stunden einsetzende Reaktion auf Pathogene aus, während das adaptive Immunsystem Tage bis Wochen dafür benötigt. Letzteres ist in der Lage, spezifischer auf die Erreger zu reagieren und sie zu eliminieren, da es antigen-spezifisch funktioniert. Die schnelle Reaktionsfähigkeit des angeborenen Systems beruht auf der Präsenz von keimbahncodierten Rezeptoren, die ohne weitere Reifung häufig vorkommende Merkmale, sog. *patterns*, von Pathogenen erkennen. Alle Immunzellen stammen aus einer hämatopoetischen Stammzelle im Knochenmark. Hier differenzieren sie zu Vorläuferzellen und weiteren Entwicklungsstufen bis hin zu einzelnen Immunzellen, welche in sekundären lymphatischen Organen zu Effektorzellen aktiviert werden können (Murphy et al., 2009).

1.1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem wurde bereits 1902 in Ansätzen von Ilya Metchnikoff in seinen Grundzügen beschrieben (Metchnikoff, 1902). Etwa 99% aller Infektionen werden durch die Mechanismen des angeborenen Immunsystems beherrscht (Hörner et al., 2004). Diese Systeme greifen ineinander über, stehen in Beziehung zu einander und bedienen sich teilweise der gleichen Mechanismen (Schenck and Kiyono, 2001).

Die Wissenschaft konzentrierte sich lange Zeit auf das erworbene Immunsystem, da es als effektiver und überlegener erachtet wurde. Mittlerweile ist bekannt, dass das angeborene Immunsystem die Infektion nicht nur eindämmt, bis die adaptive Immunantwort bereit ist. Auch die Initiation der adaptiven Immunantwort ist Teil der Aufgabe des angeborenen Immunsystems (Hörner et al., 2004). Die äußeren Schutzbarrieren können von Pathogenen überwunden werden, was in den meisten Fällen vom Immunsystem registriert wird. Hierbei übernimmt das unspezifische Immunsystem eine zentrale Rolle. Phagozyten wie Monozyten, Granulozyten und Makrophagen sind in der Lage, Fremd-Eiweiße und Mikroorganismen aufzunehmen und zu verdauen. Ebenso wandern Mastzellen in das Gewebe und schütten toxische Granula über eingedrungene Pathogene aus (Murphy et al., 2009). Zu den Zelltypen des angeborenen Immunsystems gehören Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und NK-Zellen. Ergänzend sind die löslichen Plasmaproteine von Relevanz, die gemeinsam das Komplementsystem bilden (Beutler, 2004). Makrophagen, dendritische Zellen, neutrophile Granulozyten und Mastzellen besitzen auf ihrer Oberfläche sogenannte *Pattern- Recognition Rezeptoren* (PRR's). Diese erkennen typische Pathogenstrukturen auf den Erregern, die als *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs) bezeichnet werden. Ein Erkennen der PAMPs durch die PRRs führt zu einer direkten Aktivierung dieser Zellen. Als wichtige Effektorfunktion tritt hier die Phagozytose auf. Es können zudem auch Zytokine und andere Mediatoren freigesetzt werden, die eine weitere Immunantwort bewirken und weitere Abwehrzellen anlocken (Gasteiger et al., 2017; Murphy et al., 2009). Das angeborene Immunsystem besteht zusammenfassend aus einer Vielzahl spezialisierter Zelltypen. Eines dieser Zelltypen sind die Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), die in den experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit gezielt eingesetzt und in späteren Abschnitten näher erläutert werden.

1.1.1.2 Erworbenes Immunsystem

Schafft das angeborene Immunsystem es nicht, den Erreger oder die Infektion zu bekämpfen, wird das erworbene bzw. adaptive Immunsystem aktiviert. Es besteht aus wenigen, aber hochspezialisierten Zelltypen, den B- und T-Lymphozyten und den von den B-Zellen produzierten Immunglobulinen und Antikörpern (Hörner et al., 2004; Murphy et al., 2009). Im Gegensatz zu dem angeborenen Immunsystem werden diese Lymphozyten erst Stunden bis Tage nach der Infektion aktiviert und tragen spezifische Oberflächenrezeptoren, die fremde Strukturen erkennen. Das Vorhandensein einer adaptiven Immunantwort befähigt den Körper, sich an Erreger zu erinnern und so schneller handeln zu können. Dieses System zeichnet sich durch ein kontinuierliches und lebenslanges „Erinnern“ an spezifische Pathogenmuster aus (Hoffmann et al., 1999). Bei der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses differenziert sich ein gewisser Teil der aktivierten B- und T- Lymphozyten zu langlebigen Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion schnellere, präzisere und effektivere Immunantwort ermöglichen (Ahmed and Gray, 1996; Kirman et al., 2019).

Darüber hinaus befähigt es den Körper zum hochspezifischen Erkennen bestimmter Antigene und deren Zerstörung mit Hilfe von angeborenen Immunzellen. Die Pathogenerkennung basiert auf spezifischen Antigen-Rezeptoren der Immunglobulin-(Ig)Superfamilie, die durch zufälliges Mischen der Gene immer wieder neu generiert werden (Tonegawa, 1983, 1988). Während sich die angeborene Immunität auf die Erkennung von weit verbreiteten und häufigen Pathogenmustern beschränkt, erlaubt die erworbene Immunität eine gezielte Bekämpfung bestimmter Erreger bzw. geschädigter Zellen und besitzt damit eine höhere Sensitivität und Spezifität.

1.1.2 Natürliche Killerzellen: Überblick und Charakterisierung

Bereits 1975 entdeckten *Kissling et al.* granuläre Zellen, die ohne eine vorherige antigenspezifische Sensibilisierung eine schnelle zytotoxische Reaktion gegen „Moloney-Leukämiezellen“ zeigten. Sie nannten sie Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) (Kiessling et al., 1975). Mit einem Anteil von 10-15% der peripheren Blutlymphozyten bilden NK-Zellen eine heterogene Lymphozytenpopulation des angeborenen Immunsystems mit einer Lebensdauer von einigen Tagen bis Wochen. Die Mehrheit der Zellen zählt zu den groß-granulären Lymphozyten (Lazetic et al., 1996; Timonen et al., 1981; Timonen and Saksela, 1980). Sie bilden die vorderste Verteidigungslinie gegen Virusinfektionen, maligne Transformationen und geschädigtes Gewebe (Colucci et al., 2003; Lazetic et al., 1996; Murphy et al., 2009).

Postembryonal entstehen NK-Zellen im Knochenmark im Rahmen der Hämatopoese. Sie stammen, wie auch Erythrozyten, Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten, aus einer multipotenten CD34⁺ hämatopoetischen Stammzelle ab (Colucci et al., 2003; Freud et al., 2006). Die Stammzellen differenzieren zunächst zu lymphatischen Vorläuferzellen, die sich anschließend zu NK-Zellen entwickeln. Neben dem Knochenmark können auch Lymphknoten, Milz und Thymus als Orte der Differenzierung fungieren. Die Zytokine IL-2 und IL-15 unterstützen diese Differenzierung, bis CD34⁺ Vorläuferzellen in die Lymphknoten wandern, dort zu reifen NK-Zellen differenzieren und ihre Aktivierung erfolgt (Caligiuri, 2008; Fehniger et al., 2003; Freud and Caligiuri, 2006; Mrozek et al., 1996). NK-Zellen werden phänotypisch anhand ihrer Oberflächenproteine charakterisiert. Diese werden nach der internationalen CD-Nomenklatur für Differenzierungsantigene benannt. Es existieren zwei Haupt-Subpopulationen von reifen NK-Zellen. NK-Zellen mit einer geringen Expression von CD56 und einer hohen Expression an CD16 auf ihrer Oberfläche werden als CD16⁺ CD56^{dim} bezeichnet. Daraus resultieren ca. 90-95% aller reifen NK-Zellen. Sie weisen sich durch eine geringe Produktion an Zytokinen, eine hohe Zytotoxizität und ihr hauptsächliches Auftreten in der Peripherie aus. Ihre Hauptfunktion liegt in der direkten Abtötung von Zielzellen. Die zweite Subpopulation der NK-Zellen bilden die CD16⁻ CD56^{bright} -Zellen. Sie weisen eine geringe Expression an CD16 auf ihrer Oberfläche auf, dafür eine hohe Expression an CD56 und machen

etwa 5-10% der reifen NK-Zellen aus. Sie sind gekennzeichnet durch eine hohe Produktion von Zytokinen, eine geringe Zytotoxizität und ein Auftreten in den Lymphknoten (Colucci et al., 2003; Colucci et al., 2002; Cooper et al., 2001; Fehniger et al., 2003; Nagler et al., 1989). Die hohe Fähigkeit zur Zytokinproduktion wie des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interferon- γ (IFN- γ) und des Granulazyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktors (GM-CSF) steuern immunregulatorische Prozesse und sind essenziell für die Schnittstelle von angeborenem und erworbenen Immunsystem (Bluman et al., 1996; Fauriat et al., 2010; Vivier et al., 2011; Vivier et al., 2008). IFN- γ trägt vor allem zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen bei (Hörner et al., 2004).

Der Metabolismus der NK-Zellen ist hochkomplex: Die NK-Zellen gewinnen 70% ihres Energiebedarfs aus der Oxidativen Phosphorylierung (Vander Heiden et al., 2009), allerdings scheinen sie auch unter bestimmten Bedingungen in Abwesenheit von Sauerstoff Glykolyse zu betreiben (Donnelly et al., 2014; Viel et al., 2016). Die Glukoseaufnahme wird über GLUT-1 Transporter, einen glukoseunabhängigen Glukosetransporter bei den NK-Zellen reguliert, der entscheidend für die schnelle Proliferation und Zytokinproduktion in den NK-Zellen ist (Macintyre et al., 2014; Michalek et al., 2011; Szablewski, 2013).

Das oben erwähnte Zytokin IL-15 hilft den NK-Zellen nicht nur bei der Differenzierung, sondern spielt auch eine wichtige Rolle in weiteren NK-Zell-spezifischen Prozessen. IL-15 wurde ursprünglich aufgrund seiner "IL-2-ähnlichen" stimulierenden Aktivität an T-Zellen entdeckt (Giri et al., 1995). IL-15 aktiviert naive NK-Zellen, fördert ihre Proliferation und steigert ihre Zytotoxizität, durch die Produktion von Granzymen und Perforin (Anft et al., 2020; Carson et al., 1994; Kennedy et al., 2000). Darüber hinaus ist IL-15 maßgeblich von Bedeutung bei der Entwicklung, dem Überleben, der Proliferation, der Apoptose und den Effektorfunktionen von NK-Zellen. Es unterstützt die Interaktionen von NK-Zellen und anderen Immunzellen in sekundären lymphatischen Organen und der Peripherie und zeigt in verschiedenen Tumormodellen eine positive Wirkung gegen Primärtumoren und Metastasen. Eine Abwesenheit von IL-15 hingegen begünstigt nachweislich die Metastasierung (Becknell and Caligiuri, 2005; Gillgrass et al., 2014).

1.1.2.1 Zytotoxizität von NK-Zellen und ihre Rezeptoren

Die NK-Zellen exprimieren eine Reihe von Rezeptoren, über die sie Signale empfangen und weiterleiten. Diese Rezeptoren umfassen sowohl inhibitorische als auch aktivierende Mitglieder, wobei ein ausgewogenes Verhältnis zwischen ihnen entscheidend ist, um eine effiziente Immunreaktion auszulösen (Deuss et al., 2017). Typischerweise erkennen inhibitorische Rezeptoren den Major Histocompatibilitätskomplex (MHC-1), der auf allen kernhaltigen Zellen auf der Oberfläche exprimiert wird (Andrews et al., 2012; Boyington et al., 2001). Auf diese

Weise sind gesunde Zellen mit einer normalen MHC-1- Expression vor den NK-Zellen, bzw. vor dem Immunsystem geschützt. Bei Zellen mit abnormen Zellwachstum, wie bei der Tumorgenese, transformierten Zellen oder Viruszellen, kommt es zu einer reduzierten oder veränderten MHC-1- Expression. Diese werden durch die NK-Zellen erkannt und durch eine NK-Zell-vermittelte Lyse vernichtet. Diesen Vorgang bezeichnet man als „fehlende Selbsterkennung“ (Deuss et al., 2017; Kärre et al., 1986; Robertson and Ritz, 1990). Humane NK-Zellen erkennen die MHC-1-Moleküle von Targetzellen über zwei verschiedene Rezeptorfamilien: Zum einen existieren die Killerzell- Immunglobulinähnlichen Rezeptoren (*englisch: „Killer Cell IG-like receptors“*, KIR), zum anderen die später entdeckten Killerzellen Lektin-ähnliche Rezeptoren („*C-type lectin superfamily*“, NKG2 mit CD94- Untereinheit) (Braud et al., 1998). Beide Rezeptorarten haben inhibierende und aktivierende Rezeptorvarianten. KIR bindet an MHC-1-Moleküle, unterdrückt die NK-Zell-Funktion und verhindert so die Selbstzerstörung körpereigener Zellen (Shimasaki et al., 2020). Bei Zellen, die keine MHC-1-Moleküle besitzen, wie zum Beispiel eine virusinfizierte Zelle, überwiegen die aktivierenden Rezeptoren, dabei werden Aktivierungssignale freigesetzt.

Zur Ausübung ihrer zytotoxischen Funktion stehen NK-Zellen verschiedene Mechanismen zur Verfügung: Auf der einen Seite können NK-Zellen über CD16 entartete oder infizierte Zellen erkennen. Dies wird als Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (*engl: antibody dependent cellular cytotoxicity*, ADCC) bezeichnet und führt zu einer Lyse der Zellen. Auf der anderen Seite kann es zu einer Apoptose kommen, indem die NK-Zellen auf der Zielzelle FAS-Liganden (*engl. Fragment apoptosis stimulating- Ligand*), oder den TNF-verwandter Apoptose induzierter Liganden (*engl. TNF related apoptosis-inducing ligand*, TRAIL) mit ihrem FAS-Rezeptor erkennen. Die dadurch ausgelöste Freisetzung zytotoxischer Granula führen zu einer Kaspaseaktivierung mit anschließender Initiierung der Apoptose (Brodin et al., 2009; Murphy et al., 2009; Vivier et al., 2008). Voraussetzung für diese Prozesse ist die Bildung einer sogenannten Immunologischen Synapse, eines stabilen Zell-Zell-Kontaktes (Davis et al., 1999). Dieser als Degranulation bezeichnete Vorgang bei dem NK-Zellen zytotoxische Granula freisetzen, um infizierte oder maligne Zellen zu eliminieren, ist sehr komplex. Der Oberflächenmarker CD107a, auch bekannt als LAMP-1 (Lysosomal-associated membrane protein 1), dient als etablierter Indikator zur Analyse der Degranulationsaktivität von NK-Zellen im Rahmen durchflusszytometrischer Untersuchungen. Während der Degranulation fusionieren zytotoxische Vesikel mit der Zellmembran, CD107a wird auf der Zelloberfläche zugänglich und kann mittels Durchflusszytometrie detektiert werden. Zahlreiche Studien konnten eine Korrelation zwischen der CD107a-Expression und der Fähigkeit der NK-Zellen, Zielzellen abzutöten, belegen. Darüber hinaus haben *Cohen et al.* festgestellt, dass CD107a nicht nur ein Marker, sondern auch funktionell bedeutsam ist. CD107a schützt NK-Zellen, indem es die Bindung von Perforin an die NK-Zellen reduziert und so eine selbstinduzierte Apoptose verhindert (Alter et al., 2004; Cohnen et al., 2013).

1.2 PVR /CD155 als Immuncheckpoint in der Tumorbilogie

Immun-Checkpoint-Proteine sind regulatorische Moleküle des Immunsystems, die bei der Kontrolle und Steuerung der Immunantworten und Eigentoleranz essenziell sind. Bei diesen Proteinen handelt es sich um Zellrezeptoren auf Immunzellen, die entweder stimulierend oder hemmend wirken und so deren Aktivität steuern (Gaikwad et al., 2022). Eines in den letzten Jahren zunehmend in den Fokus der Tumorforschung getretenes Immuncheckpoint-Molekül ist der Poliovirusrezeptor PVR, auch bekannt als CD155. Im Folgenden wird dieses Molekül hinsichtlich seiner Struktur, Signalkaskaden und funktionellen Relevanz näher erläutert.

1.2.1 PVR: Struktur und Signalkaskaden

CD155 (PVR oder auch NECL-5) wurde 1989 zum ersten Mal als Rezeptor des Poliovirus (poliovirus receptor = PVR) identifiziert und ist ein Typ 1-Transmembran Glyko-Protein (Mendelsohn et al., 1989). Auf Chromosom 19 liegt das kodierende Gen für PVR. Das alternative Spleißen seiner mRNA führt zu vier Isoformen des Proteins. Diese vier Isoformen bestehen aus zwei membranständigen Domänen (α , δ) und zwei löslichen Proteinen (β , γ), deren Transmembrandomäne fehlt und deren biologische Funktion bis heute noch nicht abschließend geklärt ist. Bestätigt ist, dass die α -Isoform eine längere C-Terminal- Domäne aufweist und einen ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*) besitzt, der wichtig für die intrinsische Funktion von Tumorzellen ist (Koike et al., 1990; Liu et al., 2021; Masson et al., 2001). Diese längste Isoform von CD155 besteht aus drei extrazellulären Immunglobulin (Ig) Domänen: D1, D2, D3. Dazu kommt eine Transmembran-Domäne und eine intrazelluläre Domäne mit einem ITIM-Motiv (Bowers et al., 2017; Yu et al., 2009; Zhan et al., 2022; Zhang et al., 2008). Die extrazelluläre Domäne D1 ist dabei relevant für die Interaktion mit DNAM- 1 und TIGIT (de Andrade et al., 2014; Martinet and Smyth, 2015). CD155 gehört zugleich zur Familie der nectin-ähnlichen Moleküle (NECLs) und wird als NECL-5 bezeichnet. Befinden sich zwei NECL-Moleküle auf derselben Plasmamembran, formen sie als erstes ein cis-Dimer (siehe Abbildung 1) (Takai et al., 2008). CD155 ist in den meisten Organen von Erwachsenen nachweisbar, im Normalgewebe nur in geringen, im Tumorgewebe meist in hohen Konzentrationen (Bowers et al., 2017; Martinet and Smyth, 2015; Masson et al., 2001; Zhan et al., 2022). Bereits 1989 konnten Mendelsohn et al. CD155-mRNA in zahlreichen Geweben nachweisen, darunter auch mit schwacher Expression im Thymus (Baury et al., 2003; Mendelsohn et al., 1989). Eine erhöhte Expression an CD155 steht im Kontext mit einer schlechten Prognose und einer starken Tumorausbreitung. Die Serumkonzentration der löslichen Isoform ist bei Krebspatienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöht und korreliert positiv mit dem Tumorstadium. Demzufolge könnte das CD155-Expressions-Level in Tumorzellen mit der Aggressivität des Tumors in Verbindung stehen (Iguchi-Manaka et al., 2016). Darüber hinaus führte ein Knockdown von CD155 in Tumorzellen zu einer Reduzierung der Tumorüberlebensrate und zusätzlich zu einer Reduzierung

der Migration von Tumorzellen *in vitro*. Die Expression von CD155 wird durch verschiedene Stimuli hochreguliert, darunter Lipopolysaccharid (LPS), inflammatorische Zytokine (IFN- γ , IL-6), DNA-Zerstörung, Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Reaktive Stickstoffspezies (RNS). Die PVR- Expression wird durch zelluläre Proliferations- und Differenzierungspaths, wie RAS reguliert. Das Onkogen c-MYC, welches ebenfalls in vielen Tumoren überexprimiert ist, ist an der Regulation von PVR beteiligt (Zhan et al., 2022).

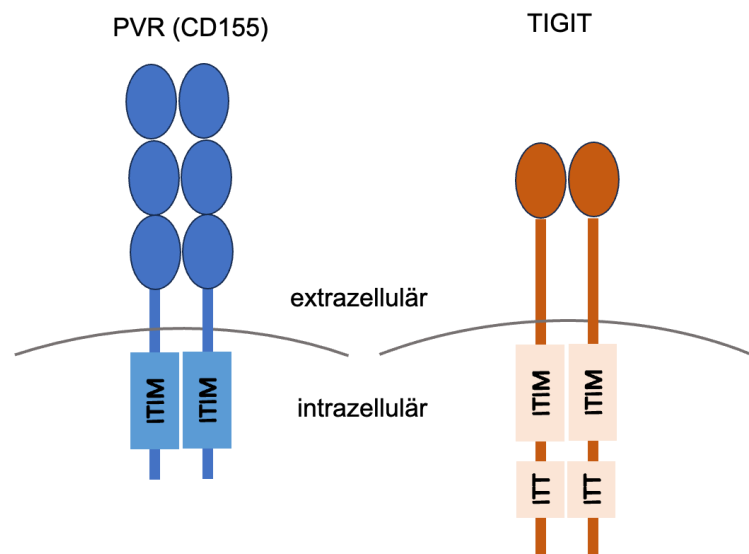


Abbildung 1: Schematische Darstellung des PVR- und TIGIT-Rezeptors. Links: Die längste Isoform von CD155 besitzt drei Extrazelluläre-Immunglobulin (Ig)-Domänen, eine Transmembran-Domäne und eine Intrazelluläre-Domäne, die ein ITIM-Motiv enthält. Es wird ein cis-Dimer gebildet, was zur charakteristischen Struktur und Funktion des PVR-Rezeptors beiträgt. **Rechts:** Das Dimer TIGIT verfügt über eine extrazelluläre Immunglobulin-Domäne und einem kurzen intrazellulären Teil, welcher ein ITIM und ein ITT Motiv beinhaltet.

1.2.2 Aufgaben, Wirkung und Bindungspartner von PVR

PVR ist in zentrale zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Kontakt-Inhibierung, Migration und Proliferation involviert (Takai et al., 2008). Zahlreiche Studien belegen, dass PVR ein hohes immunregulatorisches Potential besitzt, indem es mit verschiedenen (ko-) stimulatorischen Rezeptoren wie DNAM- und den inhibierenden Rezeptoren TIGIT (*T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains*) und CD96 interagiert. Diese Interaktionen können entweder eine Aktivierung oder Inhibierung von Immunzellen bewirken (Bowers et al., 2017). In Tumoren ist die Balance zwischen aktivierenden und inhibierenden Signalen gestört. Eine Überexpression von PVR trägt entscheidend zum sogenannten „Immune Escape“ bei. Dieser Entzug der Tumorzellen vor der Immunüberwachung verhindert deren Eliminierung durch körpereigene Immunzellen (Kucan Brlic et al., 2019). Zudem konnten Sloan et al. 2004 zeigen, dass PVR für die Metastasierung eines Tumors mitverantwortlich ist. Die Zellmigration, die während der

Tumorgenese von zentraler Bedeutung ist, trägt maßgeblich zur Metastasierung und der Ausbreitung des Tumors im Gewebe bei (Sloan et al., 2004).

Die Bedeutung von PVR in der Tumorbilogie zeigt sich insbesondere in seiner Interaktion mit NK-Zellen. Die auf der NK-Zelle befindlichen Rezeptoren, wie der aktivierende Rezeptor CD226 (DNAM-1) und die inhibitorischen Rezeptoren TIGIT (T-Zell-Immunrezeptor mit Immunglobulin und ITIM-Domäne) und CD96, können mit CD155 auf Tumorzellen interagieren. Binden diese Rezeptoren CD155 auf der Tumorzelloberfläche, lösen sie verschiedene Signalkaskaden aus, wobei CD155 die höchste Bindungskapazität mit TIGIT aufweist. Danach folgt mit einer mittleren Bindungskapazität CD96, während CD226 über die niedrigste Bindungskapazität verfügt. Je nach dominierender Rezeptorbindung können immunaktivierende oder inhibierende Signale ausgelöst werden, was eine direkte Auswirkung auf die zelluläre Immunantwort gegen Tumore hat (Deuss et al., 2019; Molfetta et al., 2020; Yu et al., 2009).

TIGIT wurde erstmals im Jahr 2009 identifiziert und gehört zur Immunglobulin-Superfamilie. Hierbei handelt es sich um ein Typ-1 Transmembran-Protein mit einer extrazellulären immunglobulin Domäne und einem kurzen intrazellulären Teil, welcher ein ITIM, als auch ein „*immunoglobulin tyrosine tail*“ (ITT) Motiv enthält (Abbildung 1) (Yu et al., 2009). Die Bindung von CD155 an TIGIT auf der NK-Zelle führt zu einer intrazellulären Phosphorylierung der ITIM-Domäne des TIGIT Rezeptors und damit zu einer Hemmung der zytolytischen Funktion der NK-Zellen. Dies erfolgt durch die Reduktion der IFN- γ -Sekretion sowie der Granulapolarisation, welche letztendlich die Freisetzung zytolytischer Granula durch die NK-Zellen beeinträchtigen (Abbildung 2) und so die Induktion von Apoptose verhindern. Im Gegensatz dazu bewirkt eine Bindung von DNAM-1 oder CD96 an CD155 eine stimulierende Reaktion: die Proliferation wird angeregt und daraus resultieren zytolytische Aktivitäten, Zytokin-Sekretion, Granulation und vermehrte Adhäsion. Die Blockade von TIGIT kann *in vivo* zu einer Wiederherstellung der NK-Zell-Effektorfunktionen erschöpfter NK-Zellen führen (Zhang et al., 2018). Zudem wurde gezeigt, dass TIGIT die cis-Homodimerization von DNAM-1 auf der Zelloberfläche zerstört und somit eine Interaktion von DNAM-1 mit CD155 nicht mehr möglich ist (Johnston et al., 2014).

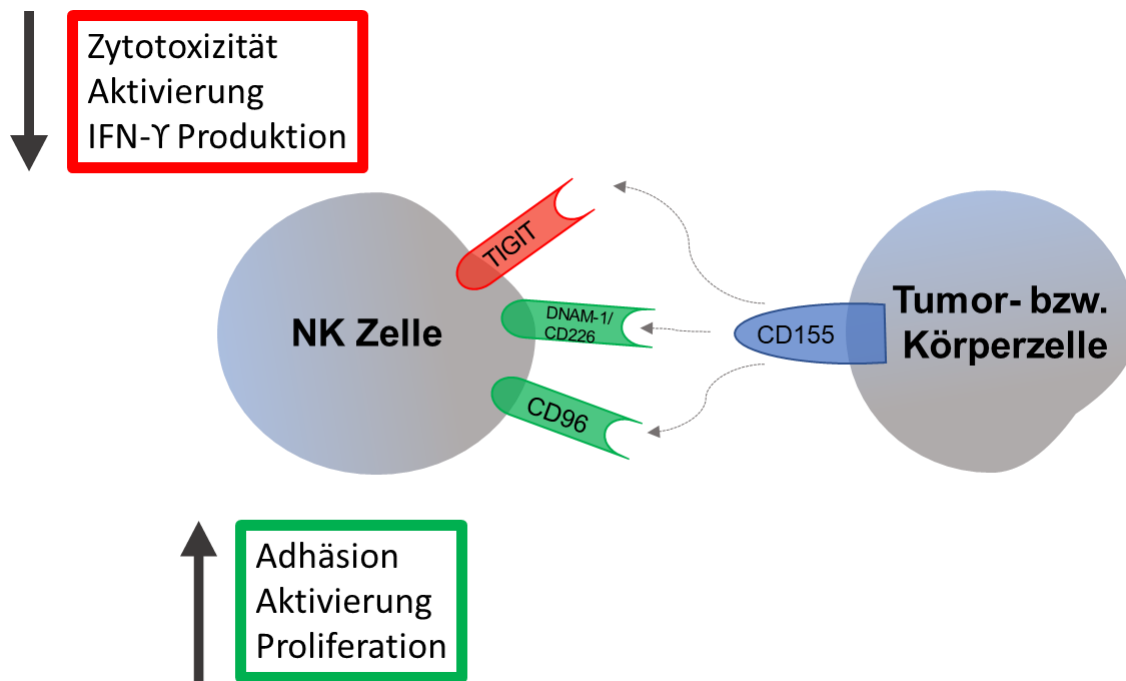


Abbildung 2: CD155-vermittelter Signalweg auf der NK-Zelle. Bei einer Interaktion von CD155 auf Tumorzellen mit dem sich auf der NK-Zelle befindlichen TIGIT kommt es zu einer Reduzierung der Zytotoxizität und der IFN- γ Produktion. Zudem kommt es auch zu einer allgemeinen Inaktivierung der NK-Zellen. Bindet CD155 allerdings an DNAM-1 oder CD96 kommt es zu einem gegenteiligen Effekt, die NK-Zellen werden aktiviert, sie proliferieren und es kommt zu einer Erhöhung der Adhäsion. Allerdings zeigt CD155 eine erhöhte Bindungskapazität zu TIGIT-Rezeptor auf.

DNAM-1 ist ein Adhäsionsrezeptor mit zwei extrazellulären Ig-ähnlichen Domänen, die an einen zytoplasmatischen Schwanz aus drei Tyrosinresten gebunden sind. Durch eine Bindung an andere Rezeptoren aktiviert dies die zytolytischen Funktionen der NK-Zellen und führt so zu einem Absterben der gebundenen Zelle (Chan et al., 2014; Lakshmikanth et al., 2009; Lupo and Matosevic, 2020; Stanietsky et al., 2009). Die Balance der inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren, bspw. TIGIT, DNAM-1 und CD96, ist ein klassisches Beispiel für die generelle Funktionsweise von NK-Zellen.

1.3 Tumorerkrankungen und Immuntherapeutische Ansätze in der Onkologie

In den vergangenen Jahrzehnten haben Forscher intensiv nach neuen Therapieformen zur Behandlung von Krebserkrankungen gesucht. Im Fokus standen die Hemmung der proliferierenden Tumorzellen und die gezielte Beeinflussung des Metabolismus von Tumorzellen (Tennant et al., 2010). Tumorzellen sind imstande, verschiedene Stoffwechselwege, bspw. die Glykolyse, zu regulieren. Zu den wichtigsten Stoffwechselwegen zählen unter anderem der PI3- Kinase/AKT/mTOR-Signalweg und der Ras/Raf/MEK-ERK-Signalweg, die nicht nur unabhängig, sondern auch in enger Interaktion wirken können. Letzterer ist in der Lage, das Zellwachstum, den Zellzyklus, die Proliferation und Apoptose zu beeinflussen (Alvarez et al., 2003;

Chang et al., 2003; Pene et al., 2002). Der PI3-Kinase/AKT/mTOR-Signalweg kann zu malignen Transformationen führen, indem er abnorme Zellproliferation fördert und anti-apoptotische Signale induziert (Baserga and Morriane, 1999).

Der deutsche Biochemiker und Arzt Otto Heinrich Warburg beschreibt zum ersten Mal in den 20er Jahren des letzten Jahrhunderts die Unterschiede des Stoffwechsels in Normal- und Tumorgewebe. Er postulierte, dass Krebszellen einen erhöhten Bedarf an Glukose aufweisen und die Glykolyse ihre Hauptenergiequelle darstellt. Ein wichtiger Vorgang, der als „aerobe Glykolyse“ bezeichnet wird, er kann auch in Abwesenheit von Sauerstoff große Mengen an Laktat produzieren. So wird Glukose über membrangebundene Glukosetransportproteine aus dem Blut und in die Zelle aufgenommen. Folglich sind die Gene der Glykolyse und Glukosetransportergene in Tumoren stark überexprimiert, auch war eine verstärkte Induktion von Glukosetransportern in Tumorgewebe feststellbar (Altenberg and Greulich, 2004; Mueckler et al., 1985; Yamamoto et al., 1990). Tumore nutzen, trotz vorhandenen Sauerstoffs, für ihren hohen Energiebedarf die anaerobe Glykolyse. Diese wirkt auf den ersten Blick sehr ineffizient, weil sie im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung (36 ATP/mol Glukose) nur 2 ATP pro mol Glukose ergibt (Gillies et al., 2008). Dies wird jedoch durch Wachstums- und Überlebensvorteile ausgeglichen. Insbesondere ermöglicht die schnelle Produktion von Laktat eine rasche Energiegewinnung und sichert ein Überleben in einem von schwankendem Sauerstoffangebot geprägten Tumormillieu (Pouyssegur et al., 2006).

1.3.1 Immuntherapeutische Einsätze von NK-Zellen beim Kampf gegen Krebs

Krebs zählt in den industrialisierten Ländern zu den drei häufigsten Todesursachen und wird voraussichtlich in naher Zukunft immer häufiger. Angesichts dieser Entwicklung ist es wenig überraschend, dass die Tumorforschung zunehmend an Bedeutung gewinnt (Murphy et al., 2009). Während Primärtumoren in vielen Fällen inzwischen chirurgisch entfernt werden können, stellt die Metastasierung der Tumoren nach wie vor eine große Herausforderung für die Medizin und die Wissenschaft dar. Um Metastasen zu bilden, müssen sich die Tumorzellen von ihrer Umgebung lösen, in Blut- und Lymphgefäße gelangen, an entfernte Gewebe anhaften und dort zu einem Sekundärtumor proliferieren. Hierbei stellt die reduzierte Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie E-Cadherin, das die Zell-Zell-Adhäsion schwächt und die Migration der Zellen erleichtert, einen zentralen Mechanismus dar (Rassow et al., 2006).

Bereits in den 1970er-Jahren erkannte F.M. Burnet, dass das Immunsystem im Stande ist, auch Tumorzellen bzw. maligne transformierte Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Ein Prozess, der als „immunologische Überwachung“ (engl. „*immunological surveillance*“) bezeichnet wird. Dabei nehmen vor allem die NK-Zellen eine zentrale Rolle ein (Burnet, 1970; Takasugi et al., 1973). Die Beobachtung, dass

eine teilweise eingeschränkte Funktion des Immunsystems mit einer erhöhten Tumorentstehung einhergeht, unterstreicht die wichtige Rolle des Immunsystems. Tumorzellen haben einige überaus gut funktionierende Mechanismen, um der Tumorüberwachung des Immunsystems zu entgehen. Hierzu zählt u.a., dass Tumore bestimmte Faktoren, wie z.B. TGF- β sezernieren, die T-Zellen direkt hemmen und so keine Immunantwort ausgelöst wird (Gorsch et al., 1992). Eine weitere Möglichkeit, wie der Tumor sich gegen eine Immunantwort des Körpers wehren kann, ist eine Interaktion von FAS (*TNF receptor superfamily, member 6*) und seinem Liganden FASL. Tumore exprimieren FASL auf ihrer Oberfläche und können so die T-Zellen vorzeitig in die Apoptose führen (Seino et al., 1997). Zudem leiden viele Tumorkrankpatienten an einer Unterdrückung ihres Immunsystems. Dies zeigt sich unter anderem in einer Reduktion der NK-Zellen, unabhängig von der Tumorart (Molling et al., 2005). Tumorzellen besitzen die Fähigkeit zu einer Herunterregulierung der Antigenpräsentation auf der Oberfläche und Verminderung von MHC-I. So können sie von den cytotoxischen T-Lymphozyten nicht mehr erkannt und eliminiert werden (Hicklin et al., 1999).

Neben der erfolgreichen Etablierung therapeutischer Antikörper rücken zunehmend die NK-Zellen in den Fokus der Krebsforschung und werden für die Tumorzelltherapie schon seit längerem in Betracht gezogen. Sie sind sehr effektiv, entartete Zellen abzutöten, aber gleichzeitig gesunde Zellen zu schonen. Gleichzeitig weisen sie ein Potential zur Eliminierung von Metastasen auf (Smyth et al., 2002). Im Vergleich zu T-Zellen besitzen NK-Zellen einen entscheidenden Vorteil: Sie benötigen keine vorherige Immunisierung oder Antigenpräsentation zur Aktivierung (Colucci et al., 2003). Zusätzlich ist eine hohe NK-Zell-Infiltrierung im Tumorgewebe mit einer besseren Prognose assoziiert (Stangl et al., 2018; Stojanovic and Cerwenka, 2011; Stojanovic et al., 2013). Ebenso wird das „*missing self*“, die verminderte Expression der MHC-I Moleküle auf Tumorzellen von NK-Zellen erkannt und können so entarteten Zellen angreifen (Karre et al., 1986). Darüber hinaus exprimieren viele transformierte Zellen vermehrt das Molekül MICA (*major histocompatibility complex class 1 chain related A*), einen Liganden für den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D, wodurch eine effektive Immunantwort ausgelöst werden kann (Murphy et al., 2009; Rink et al., 2012). Aufgrund dieser Eigenschaften gelten NK-Zellen seit Jahren als vielversprechende Kandidaten in der Krebsforschung (Terme et al., 2008).

Ein Beispiel für den therapeutischen Einsatz von NK-Zellen ist ihre Fähigkeit, im Rahmen einer haploidentischen, T-Zell-depletierten Stammzelltransplantation leukämische Zellen des Empfängers gezielt zu eliminieren, ohne dabei eine gefährliche, durch T-Zellen vermittelte Abstoßungsreaktion auszulösen (Ruggeri et al., 2007). Trotz immenser Fortschritte in der NK-Zell-basierten Therapie zeigen Ansätze, z.B. die Immunstimulation mit Interleukin-2 oder die Verabreichung voraktivierter NK-Zellen, bislang nur moderate Erfolge: Bei Patienten mit malignem Melanom oder Nierenzellkarzinom wurde lediglich in 15–30 % der Fälle ein Ansprechen beobachtet, zudem sind diese Therapien häufig durch schwere Nebenwirkungen limitiert (Kammula et al., 1998; Rosenberg et al., 1993). Ein innovativer Ansatz innerhalb der NK-Zell-

Therapie ist die Entwicklung von CAR-NK-Zellen (chimeric antigen receptor NK cells). Diese Strategie zielt darauf ab, die therapeutische Wirksamkeit von NK-Zellen durch genetische Modifikation zu steigern. CAR-NK-Zellen, die auf verschiedene Tumortypen abzielen und primäre NK-Zellen als Träger verwenden, werden derzeit in präklinischen und klinischen Erststudien untersucht (Kloess et al., 2019; Lowry and Zehring, 2017). Darüber hinaus werden NK-Zellen im Rahmen der Antikörper-vermittelten Immuntherapie eingesetzt, ein Ansatz, der bereits klinische Relevanz erlangt hat. Therapeutische monoklonale Antikörper wie Rituximab (anti-CD20) und Trastuzumab (anti-ErbB2/HER2) fördern gezielt die Aktivierung der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität durch NK-Zellen und tragen so wesentlich zur Tumorzellzerstörung bei (Sordo-Bahamonde et al., 2020).

Abschließend kann festgestellt werden: Die Immuntherapie stellt einen bedeutenden Fortschritt in der Krebsbehandlung dar. Aufgrund ihrer schnellen und ausgeprägten zytotoxischen Aktivität gelten NK-Zellen als vielversprechender Zelltyp für die Krebsimmuntherapie. Wesentliche Faktoren für den klinischen Erfolg sind die Expansion, Persistenz und Infiltration von NK-Zellen in solide Tumoren in vivo. Verschiedene Strategien und Verfahren werden derzeit entwickelt, um die antitumorale Aktivität von NK-Zellen gezielt zu verstärken. Ungeachtet erster ermutigender klinischer Ergebnisse, insbesondere bei hämatologischen Malignomen, wird häufig eine erhebliche Resistenz gegenüber NK-Zell-basierten Therapien beobachtet. Die Mechanismen dieser Resistenz sind vielfältig und hängen sowohl von der Art der Therapie als auch von der Erkrankung ab. Zu den zentralen Einflussfaktoren zählen das genetische Profil der NK-Zellen, die Biologie der Tumorzellen, die Tumormikroumgebung sowie die komplexen Wechselwirkungen mit dem Immunsystem. Diese Faktoren führen zu einer patienten- und krankheitsspezifischen Wirksamkeit der NK-Zelltherapie und eine präzise Auswahl geeigneter Patienten ist entscheidend für den Therapieerfolg. Zukünftig müssen verstärkt die Mechanismen der Resistenz in verschiedenen Kontexten aufgeklärt werden, um wirksame therapeutische Kombinationen zu entwickeln, Behandlungsprotokolle zu optimieren und die Effektivität der NK-Zell-basierten Immuntherapie nachhaltig zu steigern (Lowry and Zehring, 2017; Rezvani and Rouce, 2015; Sordo-Bahamonde et al., 2020).

1.3.2 Charakterisierung der Eingesetzten Zelllinien

1.3.2.1 HepG2-Zellen: Ein etabliertes Modellsystem in der Forschung

Die Leber ist ein zentrales Stoffwechselorgan des menschlichen Körpers, das zwischen dem Darm und dem Herzen lokalisiert ist. Über die Pfortader gelangen resorbierte Stoffe aus dem Darm zunächst zur Leber, bevor sie über die Vena cava inferior die rechte Herzkammer erreichen. In der Leber erfolgt die Verarbeitung und Speicherung (z.B. Vitamine) von Stoffwechselprodukten, die sie auch wieder gezielt abgeben kann. Weiterhin arbeitet die Leber auch als Biosyntheseort für zahlreiche

Hormone, Blutgerinnungsfaktoren oder Plasmaproteine. Eine weitere essenzielle Funktion ist die Entgiftung: Die Leber verarbeitet sowohl körpereigene Substanzen wie z.B. Bilirubin, als auch körperfremde Substanzen wie Alkohol oder Pharmaka und ermöglicht deren Ausscheidung aus dem Körper (Horn et al., 2005). Zudem gehört die Regulierung des Blutzuckerspiegels zu den wichtigen Aufgaben der Leber. Absolut erstaunlich ist die ausgeprägte Regenerationsfähigkeit der Leber: Nach einer teilweisen Entfernung kann das Organ innerhalb von etwa 6 Monaten vollständig nachwachsen (Chen et al., 1991; Michalopoulos and Bhushan, 2021). Angesichts dieser essenziellen Funktionen ist es nicht überraschend, dass eine eingeschränkte Leberfunktion schwerwiegende pathologische Prozesse im gesamten Organismus zur Folge haben kann. Die Leberforschung stellt einen zentralen Bestandteil der medizinischen Wissenschaft dar, insbesondere im Hinblick auf die Untersuchung von Lebertumoren. Lebertumoren zählen weltweit zur dritthäufigsten krebserkrankten Todesursache (Sung et al., 2021). Es gibt verschiedene Arten der Lebertumore: Ein Beispiel ist das Hepatozelluläre Leberkarzinom, mit 80-90% der Fälle weltweit (Ananthakrishnan et al., 2006). Weitere Formen sind u.a. das Angiosarkom und das Hepatoblastom, sie unterstreichen die Heterogenität dieser Tumorgruppe. Der Bedarf an Lebertumorzelllinien für die Forschung ist groß, da sie nicht nur für die Krebsforschung, sondern zudem für die Untersuchungen von Infektionen wie Hepatitis B und Hepatitis D verwendet werden.

Derzeit existieren ca. 40 verschiedene Lebertumorzelllinien, eine der am häufigsten verwendeten Zelllinien ist HepG2 (Arzumanian et al., 2021). HepG2-Zellen zeichnen sich durch die Erhaltung zahlreicher leberspezifischer Funktionen aus und werden daher intensiv für Studien über Leberkrebs und Medikamentenstoffwechsel verwendet, sowie im Bereich der Toxikologie eingesetzt. Ihre hohe Proliferationsrate und einfache Kultivierbarkeit *in vitro* machen sie zu einem wertvollen Werkzeug für die Tumorbilogie, für die Erforschung ernährungsbedingter Mechanismen und der Wirkstoffforschung (Kiseleva et al., 2023). Die HepG2-Zelllinie wurde erstmals 1975 aus einem Lebertumor eines 15-jährigen Patienten isoliert und zunächst fälschlicherweise als hepatozelluläres Karzinom eingestuft. Spätere Untersuchungen zeigten, dass es sich um ein Hepatoblastom handelt. Entsprechend ihren zytologischen Merkmalen sind HepG2-Zellen den Tumorzellen im Hepatoblastom am ähnlichsten. Gleichzeitig weisen sie einige für gesunde Hepatozyten charakteristische Merkmale auf, wie die Größe und die Zusammensetzung der Proteine. HepG2 zeigen eine epitheliale Morphologie, ähnlich der Hepatozyten. Die Leber stellt die Hauptquelle für Blutplasmaproteine wie Fibrinogen, Albumin und Globuline dar. Die vergleichende Analyse des proteomischen Profils von Hepatozyten und der HepG2-Zelllinie zeigte, dass sich die Titer von Serumalbumin, Transferrin und Serpin nicht unterschieden. HepG2 unterscheiden sich in vielen Merkmalen von Hepatozyten, weshalb eine Verwendung dieser Zelllinie als Hepatozyten-Modell umstritten ist. Hepatozyten sind reich an glattem endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien, das ihre intensive Proteinsynthese bzw. ihren Energiestoffwechsel widerspiegelt. Bei HepG2-Zellen sind diese schlecht entwickelt und die Mitochondrienzahl beträgt etwa die Hälfte im Vergleich zu normalen Hepatozyten. HepG2 enthalten fast dreimal weniger Gesamt-

Protein als Hepatozyten. Etwa 20 % der menschlichen Hepatozyten sind binuklear oder polyploid, HepG2-Zellen enthalten drei bis sieben Kerne. In Tumorzellen, die auch durch eine abnormale Anzahl von Chromosomen gekennzeichnet sind, wird eine Zunahme der Anzahl der Kerne beobachtet - bis zu sieben pro Zelle. CYP3A4, eines der wichtigsten Enzyme der Arzneimittelsplaltung ist in HepG2-Zellen 100–400-mal weniger vorhanden als in Hepatozyten. HepG2-Zellen nehmen einen Zwischenzustand zwischen normalen Hepatozyten und Tumorzellen ein (Arzumanian et al., 2021; Wiśniewski et al., 2016).

1.3.2.2 TY-82: ein Modell für Thymuskarzinome in der Krebsforschung

Der Thymus (Bries), eine unter dem Brustbein gelegen Drüse, wurde erstmals von dem griechischen Arzt Rufus von Ephesus (98-117 n. Ch.) beschrieben (Kirschner, 2000; Lavini et al., 2009). Dieser benutzte bereits in seinen Schriften den Namen Thymus. Bis heute ist die Namensgebung des Thymus *etymologisch* ein Rätsel. Es ist anzunehmen, dass sie ihren Namen bereits in der alexandrischen Medizin erhalten hat, eventuell nach den Blütenständen des Thymians, die mit den Läppchen der Drüse vergleichbar schienen (Keil et al., 2017).

Der im ventralen Bereich des oberen Mediastinums liegende Thymus besteht aus zwei meist ungleich großen Lappen (Lobi). Diese Lappen werden von einer Kapsel aus dichtem kollagenen Bindegewebe umgeben bzw. begrenzt und werden in circa 1-2 cm große Läppchen (Lobuli Thymici) untergliedert (Lippert and Deller, 2011). Sind beim Neugeborenen beide Lappen je 5 cm lang und 2 cm breit, erreicht der Thymus die größte Entfaltung beim Kleinkind und behält die Größe bis zur Pubertät bei. Nach der Pubertät verfettet der Bries, das Thymusgewebe wird weniger und bildet sich zurück, bis es beim älteren Erwachsenen makroskopisch nicht mehr klar von der Umgebung abzugrenzen ist (Lippert and Deller, 2011). Diese Rückbildung wird als Altersinvolution bezeichnet. Das Fettgewebe ersetzt das zurückgebildete Thymusgewebe, wobei primär die Rinde betroffen ist, das Mark bleibt charakteristisch als Strang erhalten. Dies geschieht ungefähr bis zum 50. Lebensjahr, kleine funktionstüchtige Reste des Thymus bleiben aber bestehen (Steinmann and Muller-Hermelink, 1985).

Der Thymus ist zeitlebens in der Lage, reife undifferenzierte und immunkompetente T-Lymphozyten bei Bedarf nachbilden (Lüllmann-Rauch R., 2019) und ist in der frühen Phase des menschlichen Lebens wichtig für die Entwicklung des Immunsystems (Metcalf, 1960; Miller, 1961). Ebenso ist er als primäres lymphatisches Organ für die Entwicklung und Differenzierung der T-Zellen verantwortlich (Aumüller et al., 2020). Als Jim Gowans in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts herausfand, dass Lymphozyten eine wichtige Rolle bei der Immunabwehr spielten, bekam auch der Thymus eine wichtigere Rolle in diesem Prozess zugesprochen (Gowans et al., 1962). Miller *et al.* fassten ein paar Jahre später all das Wissen über den Thymus und seine immunologische Funktion zusammen (Miller, 1961). So weiß man heute, dass der

Thymus nachweislich für die T-Zell (thymus-abhängige Zellen) Reifung verantwortlich ist und damit einen erheblichen Anteil an der adaptiven Immunantwort hat (Carpenter and Bosselut, 2010). Die T-Zell Reifung beginnt, nachdem T-Vorläuferzellen im Knochenmark gebildet werden und über das Blut in den Thymus gelangen (Barclay and Mayrhofer, 1981). Im Thymus angekommen erlernen die T-Lymphozyten die Unterscheidung zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“ und durchlaufen eine Reihe von Proliferations- und Differenzierungsprozessen, bis sie den Thymus wieder verlassen. Diese „Selektion“ wird als positive und negative Selektion bezeichnet (Sprent and Webb, 1995). Bei der positiven Selektion werden den Lymphozyten Antigene in Verbindung mit MHC Proteinen präsentiert. Nur Thymozyten, welche Selbst-MHC-Moleküle mit dem Prä-TCR (T-Cell Receptor) erkennen, reifen weiter heran. Werden MHC I Komplexe erkannt, reifen sie zu CD8+ T-Zellen weiter, erkennen sie indes den MHC II Komplex, reifen sie zu CD4+ T Zellen. Wird der MHC- Komplex nicht erkannt, werden die T-Zell- Vorläufer apoptotisch und sterben ab (Hogquist et al., 1994; Kisielow et al., 1988; von Boehmer, 1994; Zinkernagel et al., 1978). Bei der negativen Selektion werden die Zellen mit Hilfe eines an ein MHC gebundenes körpereigenes Antigen getestet, ob sie körpereigene Zellen fälschlicherweise erkennen würden. Ist dies der Fall, können sie dem Körper erheblichen Schaden zufügen (Autoimmun-Reaktionen) und werden darum eliminiert. Nach der Reifung im Thymus werden sie in den Blutkreislauf und so in die peripheren lymphatischen Organe entlassen (Fry et al., 1989; Kappler et al., 1987) (Sprent and Webb, 1995).

Pathologische Veränderungen im Thymus: Thymusepitheltumore (TET)

Wie bei allen menschlichen Geweben sind auch in der Thymusdrüse verschiedene pathologische Veränderungen möglich. Eine Veränderung wurde schon 1832 von Sir Astly Cooper (1768-1841) genau beschrieben (Cooper, 1832; Lavini et al., 2009): Thymusepitheltumore, TET genannt. Thymome und Thymuskarzinome sind eine sehr seltene Art der Thymusepithel-Tumoren, zählen bei Erwachsenen zu den häufigsten Neoplasien des Mediastinums (Marx et al., 2016; Pfister et al., 2017). Sie sind mit einer Inzidenz von 1-5 pro Million Einwohner sehr selten, ihr Vorkommen überwiegt im Alter von 40-70 Jahren, Männer und Frauen sind fast gleich häufig betroffen (Burger et al., 2017; Marx et al., 2016). Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Entfernung der Thymustumoren. Adjuvante Therapien wie Chemotherapie und Bestrahlung müssen von Fall zu Fall abgewogen werden (Marx et al., 2016). In einigen Studien existieren sehr hohe Rezidivraten (mehr als 50%), welches eine additive Therapie unumgänglich macht (Blumberg et al., 1995; Yagi et al., 1996).

Die in dieser Arbeit verwendete Tumorzelllinie TY82 gehört zu den Thymuskarzinomen und wurde bereits 1992 etabliert (Kuzume et al., 1992). Thymuskarzinome zeichnen sich durch eine hohe Rezidivrate sowie ein besonders niedriges Gesamtüberleben bei Patienten aus (Stremmel et al., 2007). Im Gegensatz zu Thymomen besitzen sie zudem die Fähigkeit Metastasen auszubilden (Ströbel et al., 2010). Die verwendete

TY82-Zelllinie wurde vom Pathologischen Institut der Universitätsklinik Mannheim von Frau Dr. Belharazem-Vitacolonna zur Verfügung gestellt.

1.3.2.3 Einsatz von A549- und K-562-Zellen in ergänzenden Experimenten

A549-Zellen stammen von einem Adenokarzinom eines nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms ab und wurden 1972 aus dem explantierten Tumor eines 58-jährigen männlichen Patienten isoliert. Diese Zelllinie hat sich als etabliertes Modellsystem für die Untersuchung epithelialer Tumore des oberen und unteren Respirationstraktes bewährt. A549-Zellen wachsen als adhärenter Monolayer und sind bekannt für ihre hohe Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum, weshalb sie in dieser Arbeit als Positiv-Kontrolle verwendet wurden (Foster et al., 1998; Giard et al., 1973).

Zur Analyse der zytotoxischen Effektorfunktionen von NK-Zellen wurde ergänzend einmalig die Zelllinie K-562 als Kontrolle eingesetzt. K-562-Zellen repräsentieren frühe Vorläuferzellen der Granulozytendifferenzierung und wurden 1970 aus einem Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie isoliert (Andersson et al., 1979; Lozzio and Lozzio, 1979). Charakteristisch für diese Zelllinie ist ihre rundliche Morphologie, sowie das Wachstum in Suspensionskultur als Einzelzellen (Klein et al., 1976).

1.4 **Molekulare Mechanismen des Zelltods: Grundlagen und Signalwege**

Wie stirbt eine Zelle? Carls Vogt entdeckte Mitte des 19. Jahrhunderts das Sterben der Zelle (Peter et al., 1997). Im Jahr 1951 erkannte der deutsche Entwicklungsbiologe A. Gluecksmann, dass der Zelltod bei Vertebraten eine zentrale Funktion in physiologischen Prozessen einnimmt, bevor 1972 der Begriff Apoptose geprägt wurde (Glucksmann, 1951; Kerr et al., 1972). Neben der Apoptose existieren noch andere Formen des Zelltods. Während die Nekrose meist als unkontrollierte Antwort auf eine von außen einwirkende irreversible Schädigung auftritt und mit einer entzündlichen Reaktion einher geht, ist die Apoptose ein aktiv gesteuerter Prozess, bei dem die Zelle „kontrolliert“ stirbt (Murphy et al., 2009). Zwei für diese Arbeit relevante Zelltodformen -Apoptose und Parthanatos- werden im folgenden Abschnitt näher beschrieben.

1.4.1 Apoptose und ihre Bedeutung in physiologischen und pathologischen Prozessen

Apoptose (aus dem Griechischen: *das Abfallen, der Wegfall*) bezeichnet einen physiologischen Prozess, der die Lebensdauer von eukaryotischen, diploiden Zellen im gesunden Organismus bestimmt. Dabei handelt es sich um einen programmierten Zelltod, da die Zelle den Prozess eigenständig durch die Aktivierung spezifischer

Signalkaskaden einleitet. Dies führt zu charakteristischen morphologischen Eigenschaften in der Zelle (Kerr et al., 1972; Lockshin and Williams, 1965). Die Apoptose stellt ein essenzielles genetisch programmiertes Zellsterbeprogramm dar, das maßgeblich zu einer normalen Entwicklung des gesamten Organismus, zur Aufrechterhaltung der Gewebe-Homöostase sowie zur Funktionalität des Immunsystems beiträgt (Cory and Adams, 2002; Cory et al., 2003). Störungen dieses fein regulierten Prozesses sind mit einer Vielzahl pathologischer Veränderungen assoziiert, darunter degenerative und Autoimmunerkrankungen und insbesondere maligne Tumore (Adams, 2003).

Apoptotische Zellen durchlaufen charakteristische morphologische Veränderungen: sie schrumpfen, lösen sich von benachbarten Zellen, das Chromatin kondensiert und die Zellmembran verliert ihre typische Struktur. In der Folge zerfällt der Zellkern und die Zelle fragmentiert in membranumhüllte Vesikel, sogenannte Apoptosekörper. Diese werden effizient von Phagozyten, insbesondere Makrophagen aufgenommen, ohne dabei eine entzündliche Reaktion auszulösen (Murphy et al., 2009; Schweichel and Merker, 1973; Wyllie, 1997). Die Apoptose wird durch ein fein abgestimmtes Zusammenspiel von pro- und antiapoptotischen Molekülen reguliert. Ein zentrales Beispiel hierfür ist das Tumorsuppressorgen p53, das in 50% aller Tumoren inaktiviert vorliegt (Hansen and Oren, 1997; Oren, 1999). Unter physiologischen Bedingungen wird p53 durch verschiedene zelluläre Stressfaktoren, wie DNA-Schäden oder durch die Aktivität onkogener Proteine wie RAS und MYC aktiviert (Hermeking and Eick, 1994; Kastan et al., 1991; Maltzman and Czyzyk, 1984; Serrano et al., 1997). Als Transkriptionsfaktor, reguliert p53 zahlreiche Gene, die an der Apoptose beteiligt sind. Dazu zählen BAX, NOXA und APAF-1, welche pro-apoptotische Funktionen übernehmen (Vousden and Lu, 2002). Mitglieder der BCL-2-Proteinfamilie haben eine essenzielle Bedeutung im Gleichgewicht zwischen Zellüberleben und Zelltod. Während BAX ein pro-apoptotisches Protein darstellt, wirkt BCL-2 anti-apoptotisch und fördert das Zellüberleben (Hockenbery et al., 1993; Oltvai et al., 1993). Darüber hinaus existieren sogenannte Inhibitoren der Apoptose (IAP, *Inhibitor of apoptosis protein*), welche den Zelltod gezielt unterdrücken. Vertreter wie Survivin und XIAP gehören dieser Proteinfamilie an und wirken, indem sie die Aktivität zentraler Effektorcaspasen, insbesondere Caspase 3, 7 und 9, hemmen. Auf diese Weise blockieren sie die Ausführung der Apoptose und damit den Zelltod (Salvesen and Duckett, 2002; Takahashi et al., 1998). Eine Reduzierung der Apoptose in Kombination mit einer erhöhten Zellteilung begünstigt eine Entwicklung von malignen Tumoren (Fulda, 2009). Transformierte und entartete Zellen zeichnen sich häufig durch eine Suppression apoptotischer Signalwege aus. Eine Überexpression an anti-apoptotischen Genen oder inaktivierenden Mutationen von pro-apoptotischen Genen können die Folge sein (Igney and Krammer, 2002; Vermeulen et al., 2005).

An der Regulation der Apoptose sind insbesondere Caspasen, BCL-2-Proteine und IAPs beteiligt. Caspasen, wie oben erwähnt, sind proteolytische Enzyme, die aufgrund unerwünschter unregulierter Caspaseaktivität in ihrer inaktiven Form (Procaspasen)

vorliegen und erst durch spezifische Signale aktiviert werden (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004; Kumar, 2007).

Die Apoptose wird über zwei Hauptwege eingeleitet: den extrinsischen (rezeptorvermittelte Apoptose) und den intrinsischen (mitochondrialen) Signalweg (Fulda and Debatin, 2006; Hengartner, 2000). Der extrinsische Weg wird durch Todesrezeptoren wie FAS, TNF-R1 oder die Trail-Rezeptoren an der Zellmembran aktiviert (Ashkenazi, 2002). Im Folgenden wird detaillierter auf den Signalweg eingegangen, der von dem FAS-Liganden an die Bindung des FAS-Rezeptors vermittelt wird. Die Bindung eines Todesliganden an seinen entsprechenden Rezeptor führt zur Oligomerisierung, bei der der Rezeptor eine Trimerstruktur bildet und dadurch aktiviert wird (Papoff et al., 1999; Siegel et al., 2000). In der Folge entsteht ein pro-apoptotischer Multienzymkomplex, der als DISC (death-inducing signalling complex) bezeichnet wird. Dieser Komplex setzt sich aus dem Adaptermolekül FADD (FAS-associated death domain protein), den Procaspasen 8 und 10 und dem Rezeptor zusammen (Kischkel et al., 1995). Die hohe lokale Konzentration von DISC führt zu einer Aktivierung der Procaspase 8 und -10 (Salvesen and Dixit, 1999). Die aktivierten Caspasen spalten anschließend Zielproteine wie PARP, das zu einer DNA-Fragmentierung und somit zur Einleitung der Apoptose führt (Fischer et al., 2003).

Der intrinsische Weg wird durch zellulären Stress (genotoxischer oder oxidativer) ausgelöst und durch die BCL-2-Familie kontrolliert (Liu et al., 1996; Willis and Adams, 2005). P53 fördert hier die Expression pro-apoptotischer Proteine wie BAX, das zur Schädigung der äußeren Mitochondrienmembran und zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium führt. Cytochrom c bindet an APAF-1 (apoptotic protease activating factor 1) und es entsteht ein Apoptosom (Adrain and Martin, 2001; Green and Kroemer, 2004; Hill et al., 2003; Willis and Adams, 2005). An dieses Apoptosom bindet die Procaspase-9 und bildet aktive Caspase-9-Dimere, das die Caspasen-Kaskade aktiviert und letztlich den programmierten Zelltod auslöst (Willis and Adams, 2005).

Eine etablierte Methode zur Detektion ist eine kombinierte Färbung der Zellen mit AnnexinV und 7-Aminoactinomycin (7-AAD) und anschließender FACS-Messung. 7-AAD ist ein nukleärer Farbstoff, der nur in Zellen mit kompromittierter Membranintegrität eindringt und somit die späte apoptotische Zelle und nekrotische Zelle identifiziert (Zembruski et al., 2012). AnnexinV bindet spezifisch an Phosphatidylserin, das während der frühen Apoptose von der inneren auf die äußere Zellmembranseite transloziert wird. Die Färbung mit AnnexinV/7-AAD ermöglicht eine Unterscheidung zwischen lebenden Zellen (AnnexinV⁻/7-AAD⁻), früh-apoptotischen Zellen (AnnexinV⁺/7-AAD⁻) und spätapoptotischen (AnnexinV⁺/7-AAD⁺) oder nekrotischen Zellen (AnnexinV⁺/7-AAD⁺) (Zimmermann and Meyer, 2011).

1.4.2 Molekulare Mechanismen von Parthanatos: Die Rolle von PARP-1-Aktivierung und AIF-Translokation bei der nicht-apoptotischen Zellzerstörung

Apoptose galt lange Zeit als zentrale Form des regulierten Zelltods. Es wurden allerdings in den letzten Jahren mehrere alternative Zelltodmechanismen beschrieben. Eine „relativ“ neu identifizierte Form ist der Parthanatos. In dieser Form des Zelltodes kommt es zu einer Überaktivierung von Poly-ADP-Ribose Polymerase 1 (PARP-1) in Folge von DNA-Schädigungen. Der Begriff „Parthanatos“ wurde 2009 von David *et al.* geprägt und „PAR“ steht für die Beteiligung von PARP-1, während „Thanatos“ die Personifizierung des Todes in der griechischen Mythologie ist (David *et al.*, 2009). Diese Form des Zelltodes grenzt sich klar von Apoptose, Nekrose oder anderen Typen des Zelltodes ab. Der Ablauf ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt.

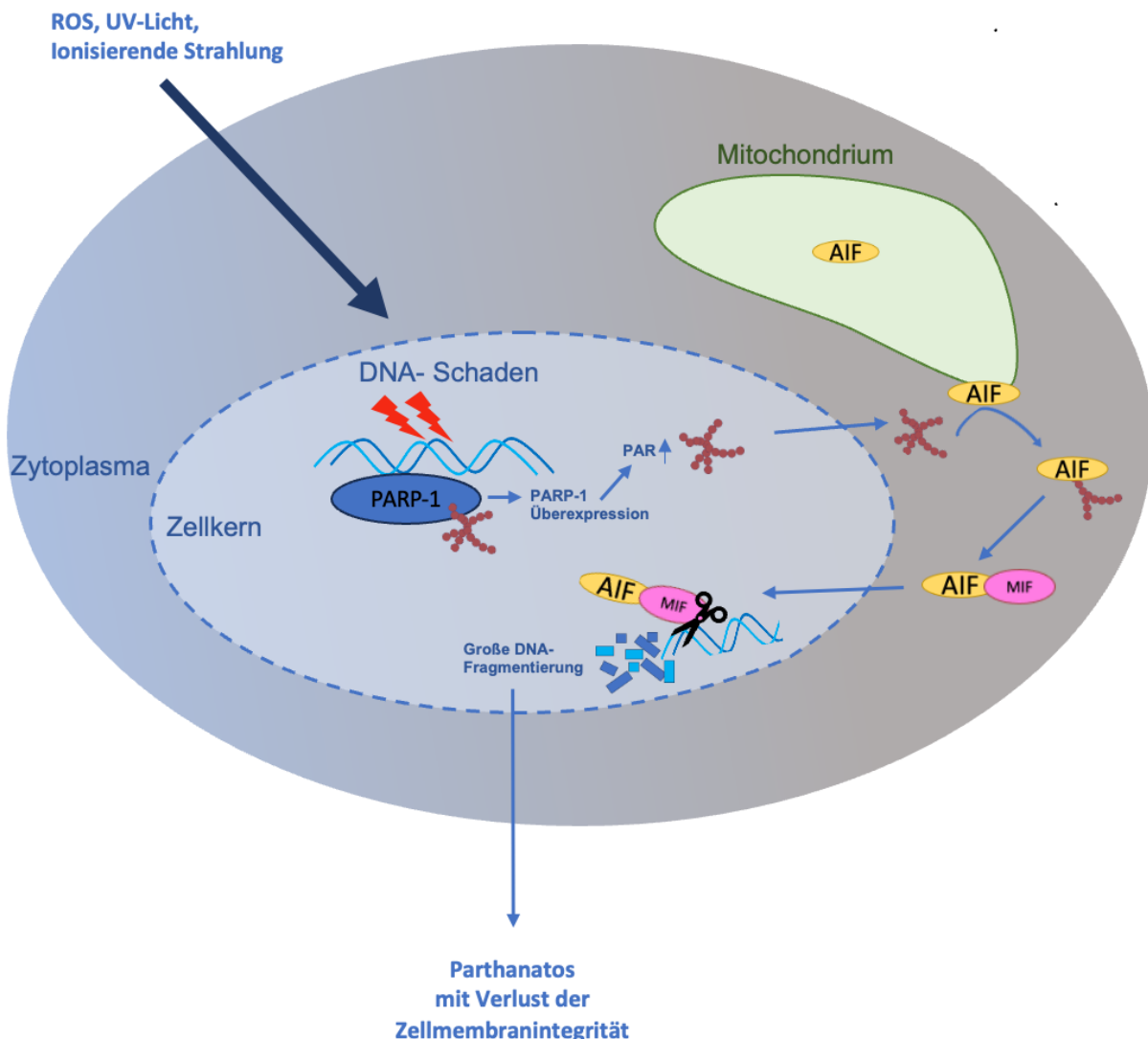


Abbildung 3: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen von Parthanatos. Große DNA-Schäden aktivieren übermäßig die Poly-ADP-Ribose Polymerase 1 (PARP-1), was zu einer Akkumulation von Poly-ADP-Ribose (PAR)-Polymeren führt. Diese induzieren die Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern, wo AIF mit MIF eine weitreichende DNA-Fragmentierung und den Zelltod auslöst.

PARP-1 ist ein Enzym, das zentral am Prozess der DNA-Reparatur beteiligt ist. Obwohl es nicht direkt an DNA-Schaden binden kann, aktiviert es zahlreiche DNA-Reparatursysteme wie DNA-Topoisomerase, DNA-Helicase und DNA-Ligase (Jagtap and Szabó, 2005). PARP-1 testet Risse und Brüche von DNA-Strängen und stellt ein DNA-Base-Exzisionsreparatursystem zusammen. DNA-Schäden können z.B. durch ionisierende Strahlung, UV-Licht und durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen. Bei leichten DNA-Schädigungen wird PARP-1 stark aktiviert und nutzt NAD⁺ um PAR-Polymere zu synthetisieren. Bei schweren Schäden führt eine Überaktivierung von PARP-1 zu einer Anhäufung von PAR-Polymeren, das zelluläre Prozesse wie Externalisierung von Phosphatidylserin, Mitochondrialmembranpotential (MMP), AIF-Kerntranslokation, massiver DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation auslöst. Diese sind typische Merkmale des Parthanatos (Huang et al., 2022). Anschließend wird PAR aus dem Zellkern in das Zytosol und in die Mitochondrien freigesetzt und bindet an den *apoptosis-inducing factor* (AIF). Dies führt zu einer Translokation von AIF aus den Mitochondrien in das Zytosol. Dort bindet AIF an den *macrophage inhibitory factor* (MIF), eine DNA-Nuklease, die DNA schneiden kann. MIF und AIF wandern in den Zellkern, MIF verursacht eine massive DNA-Fragmentierung von langen DNA-Stücken (50kb) und eine Chromatinkondensation (Liu et al., 2022). Dies führt zu einem Untergang der Zelle. Im Gegensatz zur Apoptose entstehen bei Parthanatos keine apoptotischen Körper, sondern es kommt zum Verlust der Membranintegrität. Außerdem ist es unabhängig von der Caspase-Kaskade (Liu et al., 2022). Parthanatos wird inzwischen mit einigen Erkrankungen in Verbindung gebracht, darunter Diabetes Typ1, Lungen-, Brust- und Darmkrebs, neurologische Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson und Schlaganfall, aber auch COPD und Retinitis Pigmentosa (Huang et al., 2022).

Das Wissen über die Existenz dieses Zelltodmechanismus eröffnet der Medizin eine Vielzahl an neuen Behandlungsmöglichkeiten, aufgrund des besseren Verständnisses der pathologischen Zellveränderungen. Zum einen wird AIF inzwischen als Marker für Parthanatos gesehen, zum anderen gibt es Medikamente, die genau in diesen Signalweg eingreifen können. Einige sehr erfolgreiche Medikamente gegen Krebs stellen die Gruppe der PARP-Inhibitoren dar. Diese Medikamente sind primär gegen Karzinome verschiedener Arten im Einsatz, binden an PARP-1 und verhindern so, dass die DNA repariert wird und als Folge vermehrt Doppelstrangbrüche entstehen (Amé et al., 2004; d'AMOURS et al., 1999; Huang et al., 2022; Kim and Nam, 2022). Ein Beispiel hierfür ist das Chemotherapeutikum Olaparib.

1.5 Verwendete Chemotherapeutika und ihre Wirkung auf den Körper: Cisplatin, Etoposid und Olaparib

Im Jahre 1964 entdeckte Rosenberg die zytostatische Wirkung von Cisplatin rein zufällig bei der Ergründung von elektrischen Feldern auf die Zellteilung. Dazu brachte er Platinelektroden in die Wachstumskammer von *Echerichia Coli* an. Er beobachtete

Veränderungen an den Bakterien und erkannte im Folgenden seine zellteilungsinhibierende Wirkung (Rosenberg et al., 1965; Rosenberg et al., 1969). Seit 1978 ist Cisplatin von der amerikanischen Zulassungsbehörde FDA für die Therapie von Hodenkarzinomen zugelassen (Manohar and Leung, 2018). Bis heute zählt Cisplatin zu den am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika für viele verschiedene Tumorarten, darunter Blasen-, Ovar-, Kopf- und Hals-, Hoden und Lungenkarzinome. Sein Einsatz wird durch seine enormen Nebenwirkungen beispielsweise Nephro- und Ototoxizität und seine hohe Resistenzentwicklung eingeschränkt (Dasari and Tchounwou, 2014; Siddik, 2003). Cisplatin wirkt, indem es an alle DNA-Basen bindet, bevorzugt an Guanin und Adenin. Dies führt zu Quervernetzungen und zu Cisplatin-DNA-Addukten. Diese Addukte führen wiederum dazu, dass die DNA-Replikation gestoppt wird und die Zelle in den Zellzyklus-Arrest geht (Kartalou and Essigmann, 2001; Yang et al., 2006). Dieser Arrest erlaubt nun die Reparatur der DNA-Schädigungen (Kao et al., 2001). Werden diese allerdings unvollständig repariert, induziert die Zelle den programmierten Zelltod (Apoptose)- ein Prozess, der unter anderem mit der Aktivität des Tumorsuppressor-Proteins p53 assoziiert ist (Chumakov, 2007).

Etoposid zeigt seine Wirkung auf eine andere Art: Das Chemotherapeutikum ist ein Topoisomerase-II-Inhibitor. Hauptsächlich wird Etoposid bei Hodentumoren, Kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Morbus Hodgkin und Ovarialkarzinomen eingesetzt. Durch die Bindung von Etoposid an die Topoisomerase-II wird das Enzym gehindert, DNA-Doppelstrangbrüchen zu beheben. So kommt es zu einem Stopp der DNA-Replikation und in Folge zu einer Reduzierung bzw. zu einem Stopp der Proliferation der Tumorzellen. Die Wirkung von Etoposid ist reversibel, eine längere Exposition führt entsprechend zu einer verlängerten Hemmung der DNA-Replikation (Edwards et al., 1987; Kasahara et al., 1992; Sullivan et al., 1987).

Olaparib war 2014 der erste in der EU zugelassene PARP-Inhibitor und ist primär gegen Ovarial- und Mammakarzinome im Einsatz. PARPs sind Poly(ADP-ribose)-Polymerasen, die an der Reparatur von DNA- Einzelstrangbrüchen beteiligt sind. Sie katalysieren den Transfer von ADP-Ribose an Target-Zellen. Bei der Reparatur der DNA binden PARPs an die DNA und dissoziieren von der zerstörten DNA wieder ab, um den Enzymen der Basenexzisionsreparatur (BER) Platz zu machen. Olaparib bindet an die DNA-assoziierten PARPs und verhindert so die Dissoziation von der DNA. Dadurch wird BER blockiert und kann nicht andocken, um die DNA zu reparieren. Stattdessen kommt es zu einem Doppelstrangbruch der DNA, wenn die Replikationsgabel auf PARP trifft (Amé et al., 2004; d'AMOURS et al., 1999; Kim and Nam, 2022).

1.6 Das drei-dimensionale Tumormodell: Tumorsphäroide mit ihren Chancen und Herausforderungen

Seit mehreren Jahrzehnten werden zweidimensionale (2D) Monolayerkulturen von Tumorzellen traditionell als *in-vitro* Modell für Tumoren eingesetzt (Bates et al., 2000; Bissell, 1981). Die Analyse solcher Zelllinien hat wesentlich zum Verständnis grundlegender Aspekte der komplexen Physiologie von Tumoren beigetragen (Ravi et al., 2017). Dennoch zeigte sich in zahlreichen präklinischen Studien, dass Wirkstoffe, die in 2D-Kulturen vielversprechende Effekte erzielten, *in vitro* oder in klinischen Studien leider versagten. Dies liegt vor allem daran, dass 2D-Modelle nicht die tatsächliche Physiologie des Menschen und seiner Organe reflektieren bzw. adäquat abbilden können (Żuchowska et al., 2024). Im Gegensatz dazu wachsen Tumorzellen im Körper in einer dreidimensionalen Umgebung innerhalb von Geweben und Organen. Die Abwesenheit von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen und einer dreidimensionalen Struktur, wie Tumore sie *in vivo* aufweisen, schränkt das Potential der konventionellen zwei-dimensionalen Zelllinien als Tumormodell erheblich ein (Nath and Devi, 2016).

Bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts entstanden erstmals sogenannte *multicellular tumor spheroids* (MCTs) aus verschiedenen Tumorzelllinien (Sutherland and Durand, 1976; Weiswald et al., 2015). 3D-Modelle stellen eine wichtige Weiterentwicklung dar, weil sie die Tumor-Architektur realistischer nachbilden, um ein besseres Verständnis der Komplexität der Tumor Biologie zu ermöglichen (Ravi et al., 2017; Weiswald et al., 2015). 3D-Zellkulturen bieten die Möglichkeit, die Lücke zwischen klassischen *in vitro*-Modellen und *in vivo*-Modellen zumindest teilweise zu schließen (Yoon et al., 2013). Tiermodelle, die bislang häufig zur präklinischen Testung verwendet wurden, sind nicht nur kosten- und zeitintensiv, sondern auch ethisch umstritten. Zusätzlich zeigen Tiermodelle oft eine physiologische Divergenz zwischen den Labortieren und Menschen und dies führt häufig zu einer unzureichenden Übertragbarkeit der Ergebnisse. Aus diesen Gründen werden in der Wissenschaft immer mehr dreidimensionale Modelle verwendet. Studien haben gezeigt, dass die Genexpressionsprofile und die Reaktionen auf eine Behandlung von Zellen in 3D-Modellen *in vivo* ähnlicher sind als im Fall von 2D-Kulturen (Żuchowska et al., 2024). Es existieren weitere Vorteile bei der Verwendung von Sphäroids-Kulturen verglichen mit konventionellen Monolayer-Kulturen: Zellen in 3D-Zellkulturen haben einen anderen Zugang zu Sauerstoff, Nährstoffen und Mikroumgebung und zeigen so im Allgemeinen eine höhere Resistenz gegen Chemikalien, die während der Chemotherapie verwendet werden. Denn Zell-Zell und Zell-Extrazelluläre Matrix (ECM) Interaktionen in mehrschichtigen Tumorsphäroiden bilden eine Permeabilitätsbarriere, durch die therapeutische Wirkstoffe eindringen müssen. Es wird immer schwieriger für den Arzneistoff je weiter er in das Sphäroid eindringt (Abbildung 5). Die 3D-Mikroumgebung beeinflusst zudem zahlreiche zelluläre und funktionelle Aktivitäten, darunter Morphologie, Signaltransduktion, Histon-Acetylierung, Genexpression, Proteinexpression, Arzneimittelstoffwechsel, differenzierte Proliferationszonen, Lebensfähigkeit, Hypoxie, pH-Wert, Differenzierung

(epithelialer zu mesenchyalem Übergang, EMT), Migration und Arzneimittlempfindlichkeit. Demzufolge sind 3D Tumormodelle ein wertvolles Werkzeug in der Wirkstoffforschung (Ravi et al., 2017; Sant and Johnston, 2017; Yoon et al., 2013). Darüber hinaus ist einer der größten Vorteile von 3D-Kulturen die realistischere Nachahmung von interzellulären Kontakten, Zell-Zell-Kommunikation und Interaktionen mit der extrazellulären Matrix, welche für viele Signalmechanismen in der Genexpression wichtig sind (Ravi et al., 2017).

Die Bildung von Tumorsphäroiden im Labor verläuft typischerweise in drei Phasen (Abbildung 4): In der ersten Phase findet eine Aggregation von losen Zellen in den Platten statt, die durch eine Integrin-ECM Bindung charakterisiert ist. In der zweiten Phase kommt es zur Akkumulation der Tumorzellen, in denen die Tumorzellen eine Erhöhung der Cadherin Expression vorweisen und schon in eine rundere Form zusammengekommen sind. In der dritten und letzten Phase entstehen sehr kompakte Sphäroide, die durch starke Cadherin-Cadherin-Interaktionen eine ausgeprägte zelluläre Adhäsion zeigen (Lin and Chang, 2008; Shen et al., 2021).

Ultra- low attachment plates

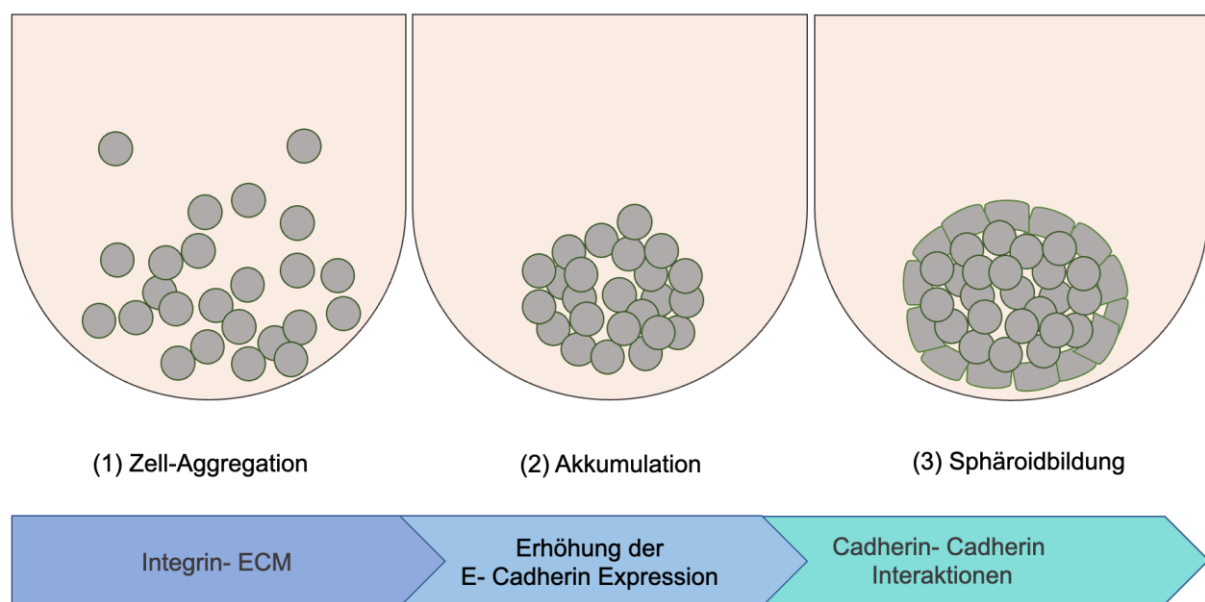


Abbildung 4: Modell der Sphäroidformation in Ultra-low attachment Platten. Die Sphäroidformation lässt sich in drei Stadien aufteilen: (1) Formation von losen Zellaggregaten via Integrin-ECM- Bindung. (2) Eine Erhöhung der E-Cadherin-Expression an den Zelloberflächen und eine Akkumulation der Zellen finden statt. (3) Cadherin-Cadherin Interaktionen resultieren in der Bildung kompakter Sphäroide.

Die Sphäroide werden aus Einzelzell-Suspensionen, unter nicht adhärenenten Bedingungen erzeugt. Der Diffusionsbereich von Sauerstoff und anderen Molekülen beträgt lediglich einige hundert μm , darum gilt ein Sphäroiddurchmesser von etwa 500

μm als optimal für Sphäroide in der Tumorforschung bzw. tumorbiologischen Untersuchungen (Chiew et al., 2017; Shen et al., 2021). Überschreitet der Durchmesser diesen Wert, bilden sich innerhalb der Sphäroide molekulare Diffusionsgradienten. Folglich werden die inneren, zentral gelegenen Zellen unzureichend mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt, während sich gleichzeitig Stoffwechselabfälle (z.B. Laktat) ansammeln. Der Mangel an Wachstumsfaktoren, Nährstoff- und Sauerstoffgradienten und die Akkumulation von Kataboliten führt zu unterschiedlichen Regionen im Sphäroid. Sphäroide bilden eine typische dreischichtige Struktur: Im Zentrum befindet sich ein nekrotischer Kern (Weiswald et al., 2015), der durch Sauerstoffmangel (Hypoxie) gekennzeichnet und auch für das Innere solider Tumoren charakteristisch ist (Nath and Devi, 2016). Hier finden sich abgestorbene Zellen und Zelltrümmer. Der Kern ist umrundet von „stillen“ Zellen, sprich vitalen, sich aber nicht proliferierenden Zellen (G_0 - Phase). Die äußere Schicht besteht aus proliferierenden und vitalen Zellen (Abbildung 5) (Lin and Chang, 2008; Mueller-Klieser, 1997; Nath and Devi, 2016; Weiswald et al., 2015).

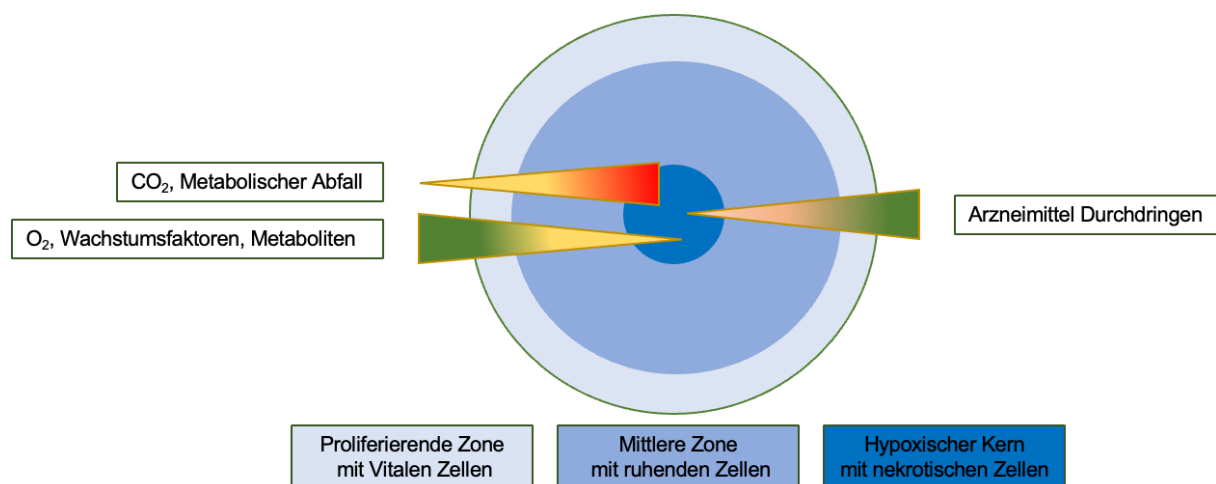


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Mikroumgebung innerhalb eines Tumorsphäroids. Dargestellt ist ein Medianschnitt durch ein Sphäroid, welcher die charakteristischen Zonen, sowie die Gradienten illustriert. Der Gehalt an Sauerstoff (O_2), Wachstumsfaktoren und Metaboliten (Pfeil) nimmt mit zunehmender Tiefe des Sphäroids deutlich ab. Der daraus resultierende Sauerstoffmangel wird durch Hypoxie induziert, welcher zur Ausbildung eines zentralgelegenen hypoxischen Kerns führt. In diesem Bereich ist die Anreicherung von metabolischen Abfällen im Vergleich zur Peripherie am höchsten (Pfeil). Der Kern des 3D-Tumors ist charakterisiert durch nekrotische Zellen. Auf den Kern folgt eine mittlere Schicht ruhender Zellen. Die periphere Schicht besteht aus proliferierenden Zellen. Die Fähigkeit eines Arzneimittels in das Sphäroid einzudringen, wird mit zunehmender Tiefe des Sphäroids reduziert.

Das Sphäroidvolumen nimmt in den frühen Stadien exponentiell zu. Nach dieser anfänglichen Expansion folgt eine sogenannte "Stabilisierungs-Phase", in der die Sphäroide eine Art dynamisches Gleichgewicht erreichen. In dieser Phase kommt es zu einer strukturellen Reorganisation, die Form wird homogener und das Volumen

nimmt ab. Diese letzte Phase ist entscheidend für die Entwicklung der funktionalen und strukturellen Organisation des Sphäroids selbst (Zanoni et al., 2020).

Die Formation von Sphäroiden lässt sich mithilfe verschiedener etablierter Methoden realisieren, die in der Literatur umfassend dokumentiert sind.

Zu den gängigen Verfahren zählen die Hanging-drop- Methode, sowie die Zugabe von aggregat-formenden Mediumkomponenten wie Methylzellulose (Yoon et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der nicht-adhärenenten Kulturoberflächen angewendet, wie in Abbildung 4 näher dargestellt. Hierfür wurden speziell beschichtete „low attachment“ Platten verwendet, um die Zellaggregation unter suspendierenden Bedingungen zu fördern. Es ist zu beachten, dass nicht alle Zelllinien die Fähigkeit besitzen kompakte und stabile Sphäroide zu bilden (Weiswald et al., 2015).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sphäroide aus Thymusepithelzell-Tumoren und Hepatozellulären Karzinomen untersucht. Momentan ist nichts über die Funktionalität und erfolgreiche Etablierung von 3D-Modellen von Thymusepithel-Tumorsphäroiden in der Literatur bekannt.

2 FRAGESTELLUNG

Diese Dissertation dient dazu die bisherigen Erkenntnisse der NK-Zell Anti-Tumoraktivität zu erweitern. Ebenso soll die Strategien der *ex vivo* Konditionierung von NK-Zellen und ihrem Einsatz in der Immunzelltherapie in Kombination mit Chemotherapeutika und der Etablierung von 3D Tumorsphäroiden untersucht werden. Hierzu sollen (1) der Einfluss von NK-Zellen auf die Viabilität und Rezeptor-Expressionen von Tumorzellen in einem Koinkubations-Modell, sowie das Ausmaß der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität und Apoptoseinduktion untersucht werden. Darüber hinaus soll (2) eine mögliche Wechselwirkung zwischen den Anti-Tumoraktivitäten von ausgewählten Chemotherapeutika oder Glukosereduzierung und NK-Zellen bei kombinierter Inkubation in 2D-Kulturen geprüft werden. Schließlich sollen (3) tumorzellbasierte Sphäroide als 3D-Modell etabliert werden.

(1) Zytotoxizität Natürlicher Killerzellen im Tumormodell

In einem etablierten Koinkubationsmodell wird der Einfluss natürlicher Killerzellen auf die Viabilität der Tumorzelllinien TY82 (Thymuskarzinom) und HepG2 (Leberzellkarzinom) untersucht. Zudem soll die Expression des Poliovirusrezeptors (PVR), der die Proliferation und Invasion von Krebszellen fördert, auf Tumorzellen sowie seine Modulation im Kontakt mit NK-Zellen analysiert werden. Ziel ist es, das zytotoxische Potenzial der NK-Zellen sowie ihre Fähigkeit zur Induktion eines programmierten Tumorzelltodes (Apoptose und Parthanatos) zu erfassen. In Ergänzung dazu wird das zytotoxische Potenzial der NK-Zellen innerhalb dieses Modells analysiert, um mögliche Veränderungen in ihrer Aktivierungs- und Funktionsweise in Anwesenheit maligner Zellen zu identifizieren. Dazu werden Veränderungen ihrer Aktivierung und Funktion mittels durchflusszytometrischer Analyse funktionsrelevanter Marker quantifiziert

(2) Tumorzell-Killing durch kombinierte Behandlung mit Chemotherapeutika und NK-Zellen

Ziel ist die Untersuchung des Effekts einer Vorbehandlung der Tumorzellen TY82 und HepG2 mit ausgewählten Chemotherapeutika und anschließender NK-Zell-Koinkubation auf die Viabilität von Tumorzellen. Auch die Auswirkungen einer Glukosereduzierung im Tumormedium auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität sollen betrachtet werden. Dabei soll insbesondere geprüft werden, ob diese Kombination synergistisch wirkt. Die zugrundeliegenden Mechanismen des Zelltodes werden mittels Durchflusszytometrie, sowie proteinbasierter Analysen charakterisiert.

(3) Die Tumorzellkulturen sollen von einer zweidimensionalen in eine dreidimensionale Form gebracht werden

Es soll die „Ultra low attachment plates“-Technik zur Generierung von 3D-Sphäroiden von TY82- und HepG2-Zellen benutzt werden, die in einer Zellsuspension unter nicht-adhäsiven Umgebungsbedingungen und in Abwesenheit von synthetischen Komponenten der extrazellulären Matrix eine spontane Bildung von Zellaggregaten ermöglicht. Die Kulturbedingungen zur Sphäroidbildung sollen mithilfe von Variation von Zellzahl und Zelltypus optimiert werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Die zur Erstellung dieser Dissertation verwendeten Geräte, Verbrauchsmaterialien, Softwares und Reagenzien sind in den nachfolgenden Tabellen thematisch und nach Versuchen zusammengefasst. Die Tabellen enthalten neben der Beschreibung zusätzlich die Namen der Hersteller.

3.1.1 Allgemeine Geräte, Verbrauchsmaterialien, Software und Reagenzien

Folgende allgemeine Geräte und Verbrauchsmaterialien wurden in dieser Dissertation verwendet:

Tabelle 1: Verwendete Geräte im Labor

Geräte	Hersteller	Katalognummer
Absaugpumpe Vacusafe	INTERGRA Biosciences	158320
Biologische Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH	51022790
CO ₂ Inkubator, Galaxy 48, 0,1-19% O ₂ -Regelung	Eppendorf SE	CO48310041
CO ₂ Inkubator, Heracell™ 150	Hearus	51026828
Compact Fluorescence Microscope BZ-X Series	KEYENCE	BZ-X810
Licht-Mikroskop Leica DMIL	Leica Biosystems GmbH	090-135-001
Mikroplatten-Reader Spark® Cyto	Tecan Trading AG	Infinite M200, NanoQuant
Mikroskop Light M, Axio Observer.Z1/Apotome, inverted	Carl Zeiss	Lima Core Facility 42226719
Multipette Eppendorf M4	Eppendorf SE	4982000012
Pipette Research Plus Einkanal 2,5µL,10µL,20µL,100µL, 200µL,1000µL	Eppendorf	3123000012;3123000900; 3124000040;3124000083
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte GmbH	9907200
ThermoMixer C Schüttler	Eppendorf	5382FQ816266
Ultraschallbad	Elma	S40

Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Inc.	SI-0236
Wasserbad	Memmert	WNB22
Zellzähler, Countes II	Thermo Fisher Scientific GmbH	AMQAX1000
Zentrifuge 5804R, 5810R	Eppendorf SE	5804R, 5810R

Tabelle 2: Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien im Labor

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Katalognummer
Alkopharm 80	BrüggemannAlcohol Heilbronn GmbH	6088000
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (1X) ohne Calcium und Magnesium	Thermo Fisher Scientific GmbH	14190-094
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) (10X)	Sigma	RNBF6338
Einweg-Zählkammern Countess II	Thermo Fisher Scientific GmbH	354480
Falcon 15 mL und 50 mL	Corning Incorporated	352196, 352070
Falcon 5 ml Polysterene round-bottom Tube	BD Biosciences	352008
H ₂ O (destilliert)	selbst hergestellt	selbst hergestellt
Isotonische Kochsalzlösung, NaCl 0,9%	Fresenius	B101153
Mikropipettenspitzen (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)	Biozym Scientific GmbH	VT0200, VT0220, VT0230, VT0240, VT0270
Nuclease freies Wasser	Ambion	AM9937
Reaktionsgefäß steril (Eppendorftube) 2 ml	Eppendorf	30.121.589
Serologische Polystyrol Pipetten 5mL, 10mL, 25mL	Sarstedt AG & Co. KG	86.1253.001, 86.1254.001, 86.1685.001
Steriles Wasser	Sigma	RNBF6963
Trypanblau (0,4%)	Thermo Fisher Scientific GmbH	T10282
Unsterile Untersuchungshandschuhe aus Nitril ECO	Semperguard	743121

Tabelle 3: Software zur Datenvisualisierung und Auswertung in dieser Dissertation

Software	Hersteller
BD FACSSuit™	BD Biosciences
Excel 2016	Microsoft Corporation
Flow Jo V12	FlowJo, LLC
GraphPad Prism 9	GraphPad Software
MAGPIX Analyser	MAGPIX®
PowerPoint 2016	Microsoft Corporation
Spark Control	Tecan Trading AG
Word 2016	Microsoft Corporation

3.1.2 Verbrauchsmaterialien und Zelllinien für die Zellkultur

Im Folgenden beschriebene Tumorzelllinien wurden im Rahmen dieser Arbeit verwendet.

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien in 2D und 3D

Zelllinie	Zellart	Herkunft
A549	Adenokarzinom der Lunge	Abcam
HepG2	Hepatoblastom	ATCC
K-562	Leukämie	Leibnitz-Institut DSMZ
TY-82	Thymic Epithelial Tumor (TET)	Pathologie Mannheim

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Medien der Tumorzelllinien und ihre Bestandteile

Zelllinie	Reagenzien	Menge
A549	RPMI	500 mL
	P/S	5 mL
	FCS	50 mL
TY82	DMEM (1x)	500 mL
	P/S	5 mL
	FCS	50 mL
HepG2	RPMI	500 mL
	P/S	5 mL
	FCS	50 mL

Tabelle 6: Spezielle Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Chemotherapie-Substanzen in der Zellkultur

Verbrauchsmaterial und Reagenzien	Hersteller	Katalognummer
Cryotube Reaktionsgefäße	Thermo Fisher Scientific GmbH	377267
Digitonin	Promega	G944A
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM (1X), 500mL	Gibco	41966-029
EDTA 0,5 M	Sigma Aldrich	E7889
Einfrierhilfe CoolCell Hochgestelltes R im Kreis fehlt	Corning Incorporated	479-1842
Einweg Zellschaber Falcon®	Corning	353085
Etoposide	Merck Millipore	33419-42-0
FBS (Fetales Rinderserum)	Life Technologies	A3160402
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare	14004040-AF
Ionomycin	Merck KGaA	56092-81-0
Monensin	BD Biosciences	51292KZ
Olaparib	Merck	763113-22-0
Pipettenspitze Combitip advanced 1mL, 2.5mL, 5mL, 10mL	Eppendorf	00300089.790,00300089.863, 00300089.871,00300089.464
Reaktionsgefäß (Eppi) 0,5 mL, 1,5mL, 2mL, 5mL	Eppendorf	0030123.301, 0030120.086, 0030120.094
Reaktionsgefäß steril (Eppi) 2ml	Eppendorf	30.121.589
RPMI 1640 Medium mit Glukose, 500mL	Gibco	21875-034
RPMI 1640 Medium mit Glukose, 500mL	Sigma- Aldrich	R8758
Staurosporin	Santa Cruz Biotechnology	62996-74-1
Trypsin-EDTA (1X) 0,25%, 100 mL	Gibco	25200-056
Unsterile Untersuchungshandschuhe aus Nitril ECO	Semperguard	743121
Zellkulturflaschen adherent (T25, T75, T175)	Sarstedt AG & Co. KG	833910502, 83.39141.002
Zellkulturflaschen nicht adherent (T25, T75, T175)	Sarstedt AG & Co. KG	834910502, 83.49141.002

Zellkulturplatten (nicht) adherent (6-, 12-, 24-, 48-, 96-Well)	Sarstedt AG & Co. KG	83.3920.500, 83.3921.500 83.3922.500, 83.3923.500, 83.3925.500
Zellkulturplatten 96-Well schwarz mit durchsichtigem Boden, flach	Greiner Bio-One GmbH	655090
Zellkulturplatten 96-Well With Lid Round Bottom, Ultra low attachment	Costar	7007

Tabelle 7: Liste der verwendeten rekombinanten Proteine

Humane Rekombinante Proteine	Hersteller	Katalognummer
IL-15	Peptrotech	200-15-100

3.1.3 Materialien und Antikörper für die Durchflusszytometrie

Im nachfolgenden werden alle benötigten Verbrauchsmaterialien, Reagenzien und Antikörper für die Durchflusszytometrie aufgelistet.

Tabelle 8: Verbrauchsmaterialien und Reagenzien zur Durchflusszytometrie

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	Hersteller	Katalognummer
Annexin V Binding Buffer, 10x	BD Biosciences	556454
BD Cytofix™ Fixation Buffer	BD Biosciences	554714
BD Phosflow™ Perm Buffer III	BD Biosciences	342003
BD Stain Buffer	BD Biosciences	554656
BDTM CellWASH	BD Biosciences	349524
BSA MACS® 10% Stocklösung	Miltenyi Biotec GmbH	130-091-376
FACS Clean	BD Biosciences	340345
FACS Cytometer Setup & Tracking Beads	BD Biosciences	656504
FACS Flow	BD Biosciences	342003
FACS Shutdown Solution	BD Biosciences	334224
LeucoSEP™-Separationsröhrchen	Greiner Bio-One GmbH	227290
LS MACS® Säulen	Miltenyi Biotec GmbH	130-042-041

Tabelle 9: Antikörperkonjugate

Antikörperkonjugate	Hersteller	Klon	Katalognummer
7-AAD perCP	BD Biosciences		550474
Annexin V APC	BD Biosciences		550475
CD107a APC	BD Biosciences	H4A3	560664
CD155/PVR PE	Biolegend	SKII.4	337610
CD3 APC	BD Biosciences	HIT3a	561804
CD3 FITC	BD Biosciences	UCHT1	561806
CD45 APC	BD Biosciences	HI30	561864
CD45 V500	BD Biosciences	HI30	560777
CD56 PE	BD Biosciences	NCAM6.2	347443
Glut-1 FITC	BD Biosciences	SLC2A	Glut-1-G25
PE Mouse IgG1K Isotyp	Biolegend	MOPC-21	400114
Zombie Violet BV421	Biolegend		423113

3.1.4 Materialien zur Reinigung der NK-Zellen mittels magnetisch-aktivierter Zellsortierung

Die folgenden Tabellen beschreiben alle zur magnetisch aktivierten Zellsortierung (MACS) verwendeten Reagenzien inklusive der benötigten Kits. Die Tabellen enthalten neben der Beschreibung zusätzlich den Namen des Herstellers.

Die Ursprungsmaterialien bestanden aus käuflich erworbenen Buffy Coats des Deutschen Roten Kreuzes (Blutspendedienst) Baden-Württemberg, Institut für Transfusionsmedizin und Immunologie Mannheim.

Die Verbrauchsmaterialien und Reagenzien zur MACS sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 10: Auflistung der verwendeten Kits zur MACS

Kit	Hersteller	Katalognummer
NK Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biontec	130-092-657

3.1.5 Reagenzien und Materialien zur Messung von Viabilität/Zytotoxizität und Caspase- Aktivität

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene zellbiologische Assays zur Bestimmung der Viabilität, Zytotoxizität und Caspase-Aktivität durchgeführt. Hierfür wurden jeweils aus mehreren Komponenten bestehende kommerziell erhältliche Kits eingesetzt. Diese sind Tabelle 11 zusammengefasst. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 11: Kits zur Messung der Viabilität/Zytotoxizität bzw. Caspase-Aktivität

Kit	Hersteller	Katalognummer
ApoTox-Glo™ Triplex Assay	Promega Corporation	G6320
Cell Titer Blue	Promega Corporation	G8080

3.1.6 Magnetic Bead Array

Im folgenden Abschnitt werden die verwendeten Kits für die Magnetic Bead Arrays aufgeführt. Verbrauchsmaterialien und Reagenzien sind Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 12: Verwendete Kits zur Multiplex Analytik

Kit	Hersteller	Katalognummer
Milliplex® Human Sepsis Magnetic Bead Panel 1	Merck Millipore	HSP1MAG-63K
Milliplex® Human CD8+ T-Cell Magnetic Bead Panel	Merck Millipore	HCD8MAG-15k

3.1.7 Allgemeine Puffer und Lösungen

Alle Prozentangaben beziehen sich auf das entsprechende Volumenprozent.

Tabelle 13: Auflistung der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Verwendung	Zusammensetzung
AnnexinV-Färbung	AnnexinV-Färbung	1800 µl Wasser + 200 µl 10 x AnnexinV Binding Buffer
PBS+	PBMC-Isolierung	500 mL PBS, versetzt mit 2 mL 0,5 M EDTA Konzentration des EDTA: 2 mM
PBS++	NK-Isolierung	2,5 mL der MACS BSA Stock Solution 10% werden bis auf 50 mL mit PBS+ Puffer (PBS mit 2 mM EDTA versetzt) aufgefüllt
Erylyse-Lösung	Erylyse (PBMC-Isolierung)	155 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM EDTA in bidestilliertem H ₂ O, 10x Lösung wird angesetzt und eine 1:10 Verdünnung verwendet

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur adhärenter Zellen

Für diese Dissertation wurden alle Arbeiten der Zellkultivierung mit sterilen Medien, Lösungen und Materialien an einer Steril-Bank durchgeführt, um Kontaminationen der Kulturen mit Bakterien oder Pilzen zu vermeiden. Alle Verbrauchsmaterialien wurden entweder sterilisiert oder steril erworben. Benötigte Medien und Reagenzien wurden vor Benutzung im Wasserbad auf 37 °C aufgewärmt, mit Reinigungsalkohol (80% Ethanol) äußerlich desinfiziert und unter die sterile Werkbank gestellt. Die verwendeten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen (T75) und 14 mL passendem Medium, das 10% hitzeinaktiviertes Kalbserum (30 Min bei 56 °C) und 1% Penicillin-Streptomycin beinhaltete, kultiviert. Die Inkubation der Zelllinien erfolgte im Brutschrank. Dieser gewährleistete eine wassergesättigte Atmosphäre bei 37°C und einem CO₂ -Gehalt von 5%. Das Medium wurde jeden zweiten bis dritten Tag gewechselt.

3.2.2 Passagierung der Zellen

Eine Passagierung der Zellen erfolgte bei einer Konfluenz von 70-90%. Hierfür wurde das entsprechende Kulturmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellen mit 3 mL PBS gewaschen. Durch den Waschvorgang wurde das verbliebene Serum entfernt, welches sonst Trypsin in seiner Wirkung inaktiviert. Im Anschluss daran wurde 3 mL Trypsin-EDTA-Lösung hinzugegeben und 3-5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Unter Kontrolle im Hellfeldmikroskop wurde gewartet, bis sich die Zellen abgelöst hatten und eine kugelförmige Gestalt annahmen. Zur Inaktivierung des Trypsins wurde die Zellsuspension mit mindestens 6 mL des frischen Mediums versehen und in neue Zellkulturflaschen überführt. Am darauffolgenden Tag folgte eine Kontrolle der Morphologie der Zellen. Bei einer erneuten Konfluenz von 80-90% der Zellen in der Flasche wurden die Zellen erneut gesplittet, bei einer Split-Ratio von 1:5, und die Passagennummer um eins erhöht. Jede Tumorzelllinie wurde dahingehend untersucht, welche Anzahl an Tumorzellen für die Versuche pro Well notwendig sind, um nach 2 Tagen eine ca. 80% Konfluenz zu erreichen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Anzahl der verschiedenen Tumorzellen pro Well in verschiedenen Wellgrößen

Tumorzelle	Anzahl der Wells pro Platte	Anzahl der Tumorzellen/Well
TY82	12-Well Platte	250.000
	96-Well Platte	40.000

HepG2	12-Well Platte	250.000
	96-Well Platte	40.000
A549	12-Well Platte	80.000

3.2.3 Bestimmung der Viabilität, Zellgröße und Zellzahl

Um eine genaue Zellzahl, Zellgröße, sowie Viabilität zu messen, wurde mit dem elektronischen Zellzählgerät Countess II nach Herstellerangaben gemessen. Hierzu wurden die Zellen gewaschen und anschließend trypsinisiert. Danach wurden die Zellen mit 10 mL Kulturmedium resuspendiert und 10 μ L der Zellsuspension zusammen mit 10 μ L Trypanblau in einer Einmalzählkammer für Countess II gegeben und in das Gerät überführt. Die Zellgröße für viable NK-Zellen, Tumorzellen und PBMCs wurden auf eine Größe zwischen 8 und 30 μ m definiert.

3.2.4 Auftauen, sowie das Einfrieren von adhärenenten Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Danach wurde die Trypsinisierung mit frischem Medium gestoppt, die Zellen in ein 50 mL Falkontube überführt und daraufhin 5 Minuten bei 1100 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Da in den weiteren Schritten DMSO benutzt wurde und DMSO (Dimethylsulfoxid) auf stoffwechselintakte Zellen toxisch wirkt (Brayton, 1986), wurden alle Arbeitsschritte mit vorgekühlten Medien und Einfrierröhrchen zügig und auf Eis durchgeführt. Das Gefrierschutzmittel DMSO dringt in die Zellen ein und führt dabei zu einer Verminderung des Wassergehaltes, wodurch die Bildung von Eiskristallen und damit eine Schädigung der Zellen verhindert werden. Das Zellpellet wurde zur Hälfte in Kulturmedium mit 20% FBS, zur anderen Hälfte in Einfriermedium (DMSO 20% und FCS 20%) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

Zum Auftauen wurden die Gefrierröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad zum Antauen gegeben. Die Zellen wurden in ein 15-mL-Falkon mit 5 mL frischem Medium überführt und resuspendiert. Nach fünf Minuten dauernder Zentrifugation bei RT und 300 g wurden die Zellen in 1 mL Medium aufgenommen und gezählt. Danach wurden sie in einer Zellkulturflasche im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag getauscht, um Reste des DMSO-haltigen Einfriermediums und tote Zellen zu entfernen. Die Passagennummer wurde nach dem Auftauen um eins erhöht.

3.2.5 3D Zellkultur: Sphäroidformation

Zur Anzucht der Sphäroide wurden die Zelllinien HepG2 und TY82 verwendet. Die Zellen wurden passagiert und gezählt, wie in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben und in 96-Well-Platten mit rundem Boden (siehe Tabelle 6) eingesät. Um eine Rundung der Sphäroide zu erzielen, wurden verschiedene Zellzahlen pro Well eingesät (1000, 5000, 10000, 20000, 40000, 60000 Zellen pro Well in 200 μ L Medium). Die Rand-Wellen der Platte wurden mit 200 μ L 1xPBS befüllt, um die Wells, in denen sich die Sphäroide befinden vor dem Austrocknen zu schützen. Die Platten wurden im Brutschrank bei 37°C, mit 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Die Tumorzellen sammelten sich am Boden und wuchsen zu kompakten Sphäroiden. Jeden Tag wurden die Sphäroide mit Hilfe eines optischen Mikroskops geprüft. Von dem Tag an, an dem die Sphäroide generiert wurden, wurde das Medium jeden zweiten Tag gewechselt. Um zu vermeiden, dass versehentlich das Sphäroid abgenommen oder das Sphäroid beschädigt wird, wurden jeweils 100 μ L Medium vorsichtig vom Rand des Wells abgezogen und durch die gleiche Menge an frischem Medium ersetzt.

3.2.6 Isolierung peripherer mononukleärer Blutzellen (PBMC) über Dichtegradientenzentrifugation

Um PBMC aus dem Blut zu isolieren, wurde eine Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Paque™ aus Buffy Coats durchgeführt. Ficoll ist ein synthetisch hergestelltes Polymer. Durch seine spezifische Dichte von 1,077 g/mL ermöglicht der Ficoll-Paque™ eine Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer spezifischen Dichte. Es besitzt eine größere Dichte als Lymphozyten und Monozyten, aber eine geringere Dichte als Erythrozyten und Granulozyten. Dadurch sedimentieren Erythrozyten auf den Boden unter die Ficoll-Schicht, während Lymphozyten sich in einer Zwischenschicht zwischen Ficoll und Überstand ansammeln (Abbildung 6) (Luttmann W. et al., 2014).

Bei der Aufreinigung von PBMCs aus einem Buffy Coat wurde zunächst das antikoagulierte Vollblut in einem Verhältnis 1:4 mit PBS+ verdünnt und langsam und vorsichtig auf 15 mL Ficoll-Paque™ in einem 50 mL Falkontube geschichtet. Anschließend wurde das Röhrchen bei Raumtemperatur für 30 Min bei 400 x g ohne Bremse und mit halber maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Nach der Zentrifugation ist eine besondere Schichtung der Blutbestandteile, wie in Abbildung 6 ersichtlich, im Falcon vorzufinden: Am Boden des Röhrchens befindet sich ein Zellpellet aus Erythrozyten und Granulozyten. Darüber folgt eine Schicht aus Ficoll, auf der ein dünner Ring mit peripheren mononukleären Blutzellen schwimmt, die Interphase. Diese ist als weiße Grenzschicht sichtbar. Zuoberst findet man eine trübe Schicht Serum, welche Thrombozyten und andere kleinste Bestandteile des Blutes enthält (Luttmann W. et al., 2014). Der schmale Interphase-Ring, der die benötigten Zellen enthält, wurde vorsichtig abpipettiert und in ein 50 mL Röhrchen überführt, mit PBS+ auf 50 mL aufgefüllt und bei 300 x g für 10 Min durch Zentrifugation gewaschen.

Anschließend wurde nochmals mit 50 mL PBS+ bei 200 x g zentrifugiert, um verbliebene Ficollreste zu entfernen. Die restlichen Thrombozyten konnten so entfernt werden. Der Überstand wurde anschließend abgesaugt und verworfen.

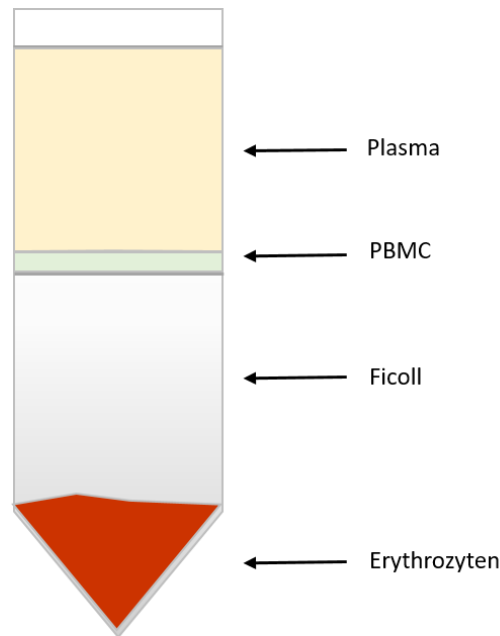


Abbildung 6: Darstellung der Schichtung von Vollblut auf eine Ficoll-Lösung nach der Zentrifugation. Zu sehen sind unterschiedliche Schichten mit den unterschiedlichen Bestandteilen des Blutes: Plasma, PBMCs und Erythrozyten.

3.2.7 Hypotone Lyse der Erythrozyten

Um alle verunreinigten Erythrozyten des Vollblutes zu entfernen, nutzten wir eine hypotone Lyse mit dem Erythrozyten-Lyse (Erylyse)-Puffer. Dafür wurden die osmotischen Eigenschaften des Kaliumchlorids genutzt. Dies führte zum Einströmen von Wasser und dem Platzen der Erythrozyten (Luttmann W. et al., 2014). Die PBMC wurden mit 5 Teilen Erylyse-Puffer (1x) versetzt und für 5-10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Lysat auf 50 mL mit PBS+ aufgefüllt und für 10 Min bei 300 x g und Raumtemperatur gewaschen. Final wurde der Überstand verworfen, frisches PBS+ hinzugefügt und die Zellen mittels Countess II gezählt.

3.2.8 Magnetische Aufreinigung von Natürlichen Killerzellen

Zur Isolierung von NK-Zellen wurden die zuvor gewonnenen PBMC verwendet und unter sterilen Bedingungen mit Hilfe der magnetisch aktivierten Zellsortierungs-Technologie (MACS) aufgereinigt. Das Prinzip beruht auf einer negativen Selektion. Das bedeutet,

dass alle peripheren Blutlymphozyten, außer NK-Zellen, mit magnetischen Beads markiert und über ein magnetisches Feld depletiert werden. So erhält man unmarkierte isolierte NK-Zellen, die zur weiteren Kultivierung zur Verfügung stehen. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten bei 4 °C bzw. auf Eis. Zunächst wurden die isolierten PBMC bei 4 °C, 10 Min und 300 x g zentrifugiert und anschließend das Pellet in 40 µL PBS++ und 10 µL Biotin-Antikörper-Cocktail pro 10^7 Zellen resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei 4 °C wurden die Zellen gemäß Herstellerprotokoll zusätzlich mit 30 µL PBS++ und 20 µL NK Zell Microbead Cocktail versetzt. Nach einer weiteren Inkubation bei 4 °C für 10 Minuten wurden die Zellen auf eine vorgespülte Säule gegeben. In Abhängigkeit zur PBMC-Gesamtzahl wurden LS (max. Anzahl markierter Zellen von 10^8) oder MS (max. Anzahl markierter Zellen von 10^7) Säulen auf einem MACS-Separator verwendet. Übrig blieben die NK-Zellen, die durch 3-faches Spülen der Säule mit jeweils 3 mL PBS++ herausgewaschen und in einem 15 mL-Falcon-Röhrchen aufgefangen wurden. Am Ende der Isolierung wurde die Viabilität gemäß Kapitel 3.2.3 analysiert und die Reinheit mittels durchflusszytometrischer Oberflächenfärbung auf CD56, CD3 und CD45 (siehe Kapitel 3.2.10) bestimmt.

3.2.9 Koinkubationsversuche in 2D

Die Tumorzellen wurden an Tag 1 in die Platten eingesät, an Tag 2 wurden die NK-Zellen isoliert und über Nacht mit IL-15 (4,5 µL/mL) stimuliert. An Tag 3 kamen der entsprechenden Koinkubationszeit die nochmals mit IL-15 (4,5 µL/mL) stimulierten NK-Zellen auf die Tumorzellen. An Tag 4 und Tag 5 fand die Ernte der koinkubierten Zellen statt. Die jeweilige Zellanzahl und Plattenart können aus Tabelle 15 entnommen werden.

In Vorversuchen haben wir festgestellt, dass in Wells, in denen Tumorzellen und NK-Zellen für mindestens 2 Stunden koinkubiert wurden, kein Trypsin verwendet werden musste. Mehrmaliges Resuspendieren des Mediums im Well sorgte für eine ausreichende Lösung der Zellen vom Plattenboden.

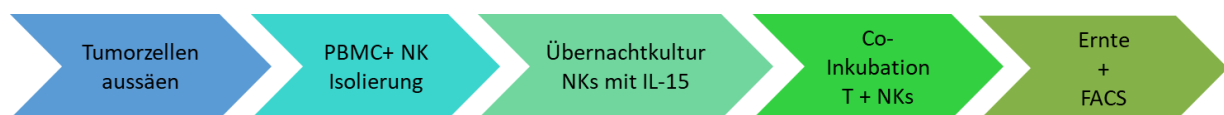


Abbildung 7: Überblick über den Versuchsablauf. Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die NK-Zell-Isolierung und übernacht IL-15-Kultivierung. Am darauffolgenden Tag werden die Tumorzellen (T) mit den NK-Zellen (NK) koinkubiert. Danach folgt die Ernte der Zellen und eine durchflusszytometrische Analyse mittels FACS.

Tabelle 15: Überblick über den Versuchsaufbau der verschiedenen Versuche besonders im Hinblick auf die Zellzahlen pro Well. MV steht für Mischungsverhältnis.

Versuch	Zellarten	Platten- größe in Well	Anzahl NKs/Well	MV T+NK	mL pro Well
AnnexinV/ 7-AAD	T+NK	12	$3,5 \times 10^6$	01-05:10	2
CD107a	T+NK	12	$3,5 \times 10^6$	01-05:10	2
GLUT-1	T+NK	12	$3,5 \times 10^6$	01-05:10	2
PVR	T+NK	12	$3,5 \times 10^6$	01-05:10	2

3.2.10 Vielfarben Durchflusszytometrie

Die Hauptaufgabe der Durchflusszytometrie oder auch FACS genannt (Fluorescence Activated Cell Sorting) besteht in der gleichzeitigen Messung von Größe und Granularität sowie bestimmten Fluoreszenzeigenschaften von Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Proben von Zellen oder Zellpopulationen und ist somit ein wichtiges Instrument in der Forschung und der klinischen Anwendung. Bei dieser Methode werden die Zellen in einer Suspension vorbereitet. Die Suspension wird zusammen mit spezifischen Antikörpern inkubiert, um bestimmte Eigenschaften sichtbar zu machen. Die zu untersuchende Suspension wird in einem Röhrchen unter eine Kapillare gehalten, die diese aufnimmt. Durch den geringen Durchmesser der Kapillare passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl einer bestimmten Wellenlänge. In neueren Geräten können auch mehrere Laser mit unterschiedlichen Wellenlängen hintereinandergeschaltet sein, um so Multiparameter-Analysen durchführen zu können. Das Laserlicht wird von den Zellen gebeugt und gestreut, was eine Analyse hinsichtlich der Größe (Vorwärtsstreulicht-FSC) und Granularität (Seitwärtsstreulicht-SSC) ermöglicht. Weitere Eigenschaften der Zelle kann man mithilfe ihrer Fluoreszenz bestimmen. Fluoreszenz bedeutet ein durch Strahlung sofort angeregtes Leuchten des Stoffes. Die meist Fluorchrom-gekoppelten Antikörper emittieren zusätzlich das Licht. Je nachdem, wie viele mit Fluorochromen konjugierte Antikörper an eine Zelle gebunden sind, strahlt diese mehr oder weniger Licht einer bestimmten Wellenlänge aus. Dieses emittierte Licht und die Streuungen werden durch variabel angeordnete Spiegel und Bandpassfilter gelenkt und durch Detektoren geleitet und gemessen. Das Gerät misst die Intensität der Floreszenzen der jeweiligen Zelle. Die am häufigsten verwendeten Fluorochrome sind Fluorescein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridinin-Chlorophyll-Protein Complex (Per-CP). Bei Mehrfachfärbungen muss auf spektrale Überlappungen der Emissionsspektren der verschiedenen Fluorochrome geachtet werden. Falls nötig, muss eine Kompensation der partiellen Überlagerung der Emissionsspektren erfolgen. Es muss allerdings auch auf Autofluoreszenzen jedes Zelltyps oder der verwendeten Chemotherapie-Substanzen geachtet werden. Darum wurde zu jedem Beginn einer Messung eine Kontrollmessung von unmarkierten Zellen durchgeführt und festgelegt, ab welcher Intensität eine Zelle als positiv gilt. Durch eine Software können die gemessenen

Signale ausgewertet werden. Die Ergebnisse werden in den meisten Fällen in zweidimensionalen Diagrammen, sogenannten „dot plots“ dargestellt. Bei dieser Form der Darstellung werden die einzelnen Antikörper, entsprechend ihrer Signalstärke durch Punkte wiedergegeben. Ein besonderer Vorteil gegenüber der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie liegt in der schnellen Messung sehr hoher Zellzahlen (10^7 in wenigen Sekunden). Durch „gating“ können auch sehr kleine Zellzahlen eines bestimmten Zelltyps gemessen und analysiert werden. Die Analyse kann mit Hilfe von Computern und entsprechender Software durchgeführt werden (Luttmann W. et al., 2014) (Herzenberg et al., 2002) (Tung et al., 2007) (Sack et al., 2006). In dieser Arbeit wurde als Durchflusszytometer das FACS LYRIC von BD verwendet und die Auswertesoftware FLOWJo. (Kapitel 3.2.18.)

3.2.11 Durchflusszytometrische Charakterisierung von NK- und Tumorzellen: Vorversuche und Gating-Strategie

Die Gating-Strategie war für alle Versuche in dieser Arbeit konstant (für alle Versuche und für jede Tumorzelllinie gleich), da sich prozentuale Aussagen in vorhandenen Gates verschieben könnten und die Vergleichbarkeit verloren gehen würde. So wurden in Vorversuchen jede einzelne Zelllinie getestet und auf unsere Gating-Strategie überprüft. Zur genaueren Differenzierung zwischen Tumor- und NK-Zellen wurden spezifische Oberflächencharakteristika genutzt. Die NK-Zellen waren CD45-positiv, Tumorzellen hingegen CD45-negativ.

Um die vom FACS-Gerät erfassten Zellen unterschiedlicher Zellpopulationen richtig zuordnen zu können, mussten diese anhand verschiedener Fluoreszenzeigenschaften durch das Definieren von „Gates“ eindeutig identifiziert und abgegrenzt werden. Die in dieser Arbeit angewandte Gating-Strategie folgte, wie in Abbildung 8 repräsentativ mit TY82-Zellen dargestellt, einem einheitlichen Prinzip: der Identifikation von CD45⁺ NK-Zellen. Zu diesem Zweck wurde zunächst in den ungefärbten Kontroll-Proben eine Grenze definiert, ab der NK-Zellen als positiv zu werten waren. Anschließend erfolgte die Darstellung des Seitwärtsstreulichts (SSC, Granularität) und des Oberflächenmarkers CD45 (V500), woraufhin die CD45⁺ NK-Zellen im sogenannten „NK-Gate“ (CD45⁺) erfasst wurden. Diese Vorgehensweise ermöglichte es, in den Proben mit gemeinsamer Inkubation von Tumor- und NK-Zellen, die NK-Zellen gezielt herauszufiltern und somit eine klare Abgrenzung beider Zellpopulationen vorzunehmen. Im zweiten Schritt wurde das zuvor definierte NK-Gate in die Tumorseite übertragen und erneut das SSC und der Oberflächenmarkers CD45 (V500) aufgetragen. Dabei zeigte sich, dass auch in der gefärbten Tumorseite sich keine Zellen innerhalb des NK-Gates befunden haben. Dieses Ergebnis wurde zuvor für alle Tumorzelllinien validiert. Anschließend wurde das NK-Gate auf die Probe mit der Inkubation von Tumor- und NK-Zellen angewendet. Je nach Zielsetzung des Experiments konnte nun entweder das NK-Gate herausgefiltert werden, um ausschließlich die Tumorzellen zu analysieren, oder es wurde gezielt das NK-Gate

verwendet, wenn die NK-Zellen im Fokus standen. Diese resultierende Zellpopulation konnte im Anschluss hinsichtlich verschiedener Parameter untersucht werden, wie z.B. verschiedene Oberflächenmarker oder die Expression von GLUT-1. Diese Marker wurden dann in entsprechenden Dot-Plots visualisiert, indem sie gegen die jeweils interessierenden Parameter aufgetragen wurden.

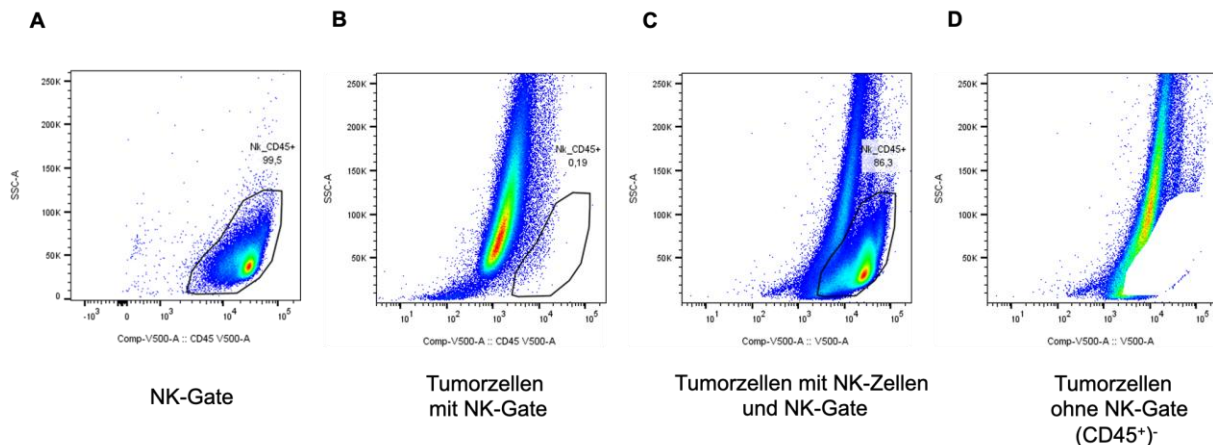


Abbildung 8: Gating-Strategie zur Identifizierung und Abgrenzung von NK-Zellen und Tumorzellen (TY82). In den Bildern A-D ist das angewandte Basis-Gating zu sehen: (A) In der Zellsuspension konnten die NK-Zellen im Seitwärtsstreulicht (SSC-A) gegen die Oberflächenfärbung CD45 (V500) dargestellt und identifiziert werden. (B) Durch die Auftragung von SSC gegen CD45 in der Tumorzellsuspension wurden die Tumorzellen dargestellt und überprüft, ob keine Tumorzellen CD45 positiv sind. (C) In der Koinkubation wurden die zwei unterschiedlichen Zellen (Tumor- und NK-Zellen) im Seitwärtsstreulicht und CD45 (V500) dargestellt. Das NK- Gate (CD45+) wurde ebenfalls übertragen. (D) Das NK-Gate wurde heraus gegatet und nur die Tumorzellen waren übriggeblieben, die dann nach gewünschten Oberflächenmarkern untersucht werden konnten.

Zusätzlich wurde die Vitalität der NK-Zellen in den jeweils verwendeten Tumormedien auf potenzielle Wechselwirkungen hin untersucht. Hierzu erfolgte eine mehrtägige Kultivierung der NK-Zellen in den verschiedenen Tumormedien, wobei täglich eine Vitalitätsanalyse mittels FACS unter Verwendung von 7-AAD und AnnexinV durchgeführt wurde (siehe Abschnitt 3.2.13). Die NK-Zellen überstanden die viertägige Kultivierungsdauer mit nur minimalen Einbußen in der Vitalität. Keines der in Tabelle 5 aufgeführten Tumormedien zeigte einen negativen Einfluss auf die Vitalität der NK-Zellen (Anhang Abbildung 47).

3.2.12 Durchflusszytometrische Analyse der metabolischen Aktivität: GLUT-1-Färbung

Die GLUT-1-Färbung wurde entsprechend des in Abbildung 9 dargestellten Versuchsschemas, durchgeführt. Nach der Ernte der Zellsuspension wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt, die komplette Zellsuspension der Wells

zentrifugiert (300 g, RT, 10 Min) und danach mit 2 mL Cellwash gewaschen. Nach einer anschließenden Zentrifugation (300 g, RT, 5 Min) wurde der Überstand abgekippt und auf das Pellet 100 µL RPMI-Medium in jedes Röhrchen gegeben. Nach kurzem Vortexen wurde in jedes der 3fach Färbungsröhrchen 5 µL GLUT-1 hinein pipettiert und 20 MIN im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 mL eiskaltes Cellwash in jedes Röhrchen hinzugegeben und danach bei 300 g für 5 Min bei 4 °C zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurden 100 µL Cellwash in alle Röhrchen pipettiert und die Oberflächenmarker wie in Tabelle 16 angegeben, hinzugefügt. Anschließend wurden diese für 15 Min im Dunkeln bei RT inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2 mL Cellwash in jedes Röhrchen und eine Zentrifugation bei 300 g für 5 Min bei RT. Nach erneutem Abkippen des Überstandes wurden 250 µL Cellwash dazu gegeben und die Proben konnten nun direkt gemessen werden. Die Werte für GLUT-1⁺ Zellen wurden prozentual angegeben.

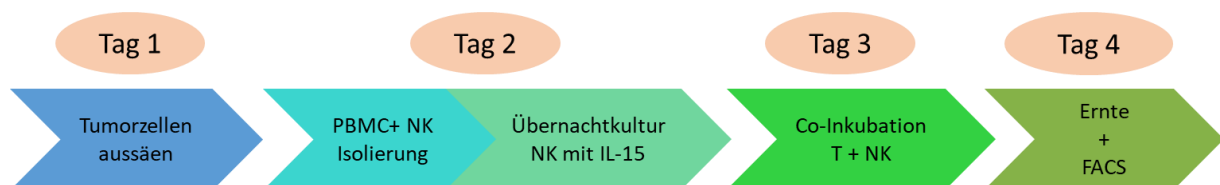


Abbildung 9: Überblick über den Versuchsablauf bei GLUT- 1 –Färbung mittels FACS-Analyse. Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die NK-Zell-Isolierung und übernacht IL-15-Kultivierung. Am darauffolgenden Tag werden die Tumorzellen (T) mit den NK-Zellen (NK) koinkubiert. Danach folgt die Ernte der Zellen und eine durchflusszytometrische Analyse mittels FACS.

Tabelle 16: Antikörpermix für 3-fach Färbung während GLUT-1- Färbung

Antikörper	Kanal	Menge pro Tube
CD56	PE	5 µL
CD3	APC	10 µL
CD45	V500	5 µL

3.2.13 Durchflusszytometrische Viabilitäts- und Zytotoxizitätsanalyse: 7-AAD/ AnnexinV-Färbung

Um früh-apoptotische Zellen zu detektieren, wurde die durchflusszytometrische Analyse von AnnexinV genutzt. Das Protein AnnexinV bindet spezifisch an Phosphatidylserin, welches im Frühstadium der Apoptose von der zytoplasmatischen Seite der Zelle an die Außenseite transloziert, bevor die Membranintegrität der Zelle zerstört wird (Koopman et al., 1994). Diese Bindung ist stark kalziumabhängig. Zudem kann AnnexinV mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden und für die flowzytometrische Analyse verwendet werden. Bei vitalen Zellen ist es AnnexinV nicht

möglich durch die Zellmembran zu gelangen, bei avitalen Zellen ist die Integrität der Zellmembran gestört und die innere Schicht ist ebenfalls zugänglich für das Protein AnnexinV (Luttmann W. et al., 2014; van Engeland et al., 1998; Vermes et al., 1995). Wenn Zellen über das Apoptosestadium hinaus nekrotisch sind und ebenfalls einen Verlust der Membranintegrität aufweisen, ist es nicht möglich nekrotische Zellen von apoptotischen Zellen zu unterscheiden. Aus diesem Grund empfiehlt sich eine zusätzliche Färbung mit 7-AAD (7-Amino-Actinomycin-D). 7-AAD weist spezifisch DNA nach und es kann nur in die Zelle eindringen, wenn ihre Zellmembranintegrität verloren geht. Wie in Abbildung 10 näher erläutert, erfolgte die Auswertung mit Hilfe des FACS-Gerätes in Form eines Dot-Plots, in dem AnnexinV auf der Abszisse und 7-AAD auf der Ordinate aufgetragen wurden. Die resultierenden Quadranten repräsentieren unterschiedliche Stadien der Zellvitalität und der Apoptose: Quadrant 4 (Q4) besteht aus Zellen, die sowohl AnnexinV, als auch 7-AAD negativ sind, bedeutet keine Apoptose oder Nekrose ist bei den Tumorzellen nachweisbar. Die Zellen gelten als vital. In Q3 spricht alles für eine ablaufende Apoptose der Tumorzellen, da sie AnnexinV⁺, aber 7-AAD⁻ sind. Hier sprechen wir von einer „Frühen“ Apoptose. In Q2 sind die Zellen doppelt positiv für AnnexinV und 7-AAD, sie geben den Anteil der nekrotischen Zellen wieder. In Q1 befinden sich die Zellen in fortschreitender „späten“ Apoptose und die Zellen sind 7-AAD⁺ und AnnexinV⁻ (van Engeland et al., 1998). Die quantitativen Angaben beziehen sich auf den prozentualen Anteil der im Analyse-Gate enthaltenen Zellen. Alle Versuche wurden in dreifacher (n=3) Ausführung durchgeführt (biologische Triplikate). Zur spezifischen Auswertung wurden die NK-Zellen vorab durch Gating ausgeschlossen, sodass ausschließlich Tumorzellen analysiert wurden.

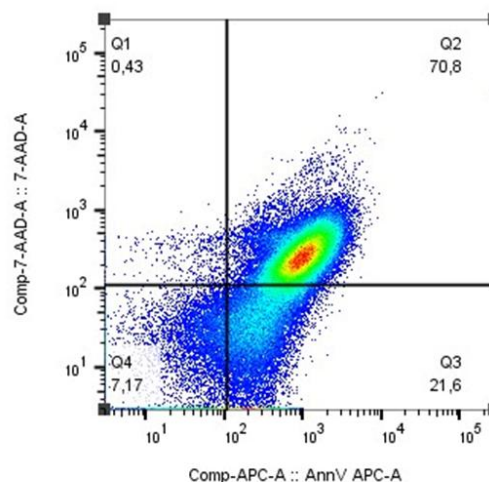


Abbildung 10: Flowzytometrische Auswertung der AnnexinV/ 7-AAD- Versuche am Beispiel der Tumorzelllinie TY82 in Koinkubation mit NK-Zellen: Quadrant 4 (Q4) ist sowohl AnnexinV als auch 7-AAD negativ, was bedeutet, dass keine Apoptose oder Nekrose bei den Tumorzellen nachweisbar ist. In Q3 spricht alles für eine ablaufende Apoptose der Tumorzellen, da sie AnnexinV⁺, aber 7-AAD⁻ sind. Hier sprechen wir von einer „Frühen“ Apoptose. In Q2 sind die Zellen doppelt positiv für AnnexinV und 7-AAD. Dies bedeutet, dass die Tumorzellen in Koinkubation mit den NK-Zellen zu 70,8% nekrotisch sind. In Q1 befinden sich die Zellen in „später“ Apoptose, die Zellen sind 7-AAD⁺ und AnnexinV⁻. Die Angaben in den Quadranten sind prozentual.

Gegenstand der vorliegenden Untersuchungsreihe war der Apoptosenachweis in Tumorzellen, weshalb zusätzlich die Zellen mit CD45 Antikörpern versetzt wurden, um die Tumorzellen von den NK-Zellen gut unterscheiden zu können. Die Werte für apoptotische bzw. nekrotische Zellen wurden prozentual angegeben. Nach der Ernte der Zellsuspension wurden die Zellen in FACS-Röhrchen überführt und 5 Min bei RT und 300 g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde in jedes FACS-Röhrchen 2 mL Cellwash (4 °C) hinzugefügt und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation bei RT und 300 g für 5 Min wurde der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von 100 µL Cellwash, wurden den FACS-Röhrchen für die Färbungen 5 µL CD45 (V500) hinzugefügt und alle Röhrchen gevortext. 2 mL Cellwash wurde nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT in jedes Röhrchen gegeben und anschließend wurden alle Tubes bei 4 °C und 300 g für 5 Min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, kamen alle FACS-Röhrchen auf ein Kühl-Rack. Nach Zugabe von 100 µL von 4 °C kaltem Binding Buffer (Tabelle 13) wurden die Röhrchen gevortext. Danach wurden 5 µL 7-AAD und 5 µL AnnexinV zu der Zellsuspension hinzugegeben und im Dunkeln bei RT für 15 Min inkubiert. Nachfolgend wurde jedes FACS-Röhrchen mit weiteren 100 µL Binding Buffer versehen und sofort bzw. innerhalb von 30 Min gemessen. So konnte die Tumor- und NK-Zell-Viabilität mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden.

Tabelle 17: Antikörpermix für 3-fach Färbung während 7-AAD/AnnexinV-Färbung

Antikörper	Kanal	Menge pro Tube
AnnexinV	APC	5 µL
7-AAD	perCP	5 µL
CD45	V500	5 µL

3.2.14 Durchflusszytometrische Degranulationsanalysen mit CD107a

NK-Zellen enthalten intrazelluläre Vesikel, um Targetzellen zu lysieren. Diese Vesikel verschmelzen bei einem positiven Stimulus mit der Zellmembran und CD107a, das in der Vesikelmembran enthalten ist, wird an der Zelloberfläche detektierbar. CD107a ist ein sensibler Marker für die Aktivierung bzw. Degranulation von NK-Zellen und die Fluoreszenzintensität der degranulierenden Zellen ist proportional zum Ausmaß der Degranulation (Alter et al., 2004; Penack et al., 2005).

Die Degranulationsanalysen wurden nach Abbildung 11 und Tabelle 18 durchgeführt. Nach der Koinkubation von NK-Zellen mit den Tumorzellen, bei der ein fluoreszentmarkierter Antikörper gegen CD107a dazu gegeben wird, kann die Expression von CD107a auf der NK-Zelloberfläche mittels FACS-Analyse sichtbar gemacht werden: Vier Stunden vor Ende der Koinkubation der Tumorzellen mit NK-Zellen wurde BD GolgiStop protein transport inhibitor (Monensin) in die

entsprechenden Wells mit einer Konzentration von 6 $\mu\text{L/mL}$ in einer 1:10 Verdünnung hinzugefügt. Ebenso CD107a in einer Konzentration von 5 $\mu\text{L/mL}$. Nach Ende der vier Stunden wurde die Zellsuspension der Wells zentrifugiert (300 g, RT, 10 Min) und danach mit 2 mL Cellwash gewaschen. Nach einer anschließenden Zentrifugation (300 g, RT, 10 Min) wurde der Überstand abgekippt und 100 μL Cellwash in jedes Röhrchen hinzugefügt. Nach kurzem Vortexen wurde in jedes der 3-fach Färbungsröhrchen 20 μL aus dem zuvor angesetzten Mix (Tabelle 18) hinein pipettiert und 15 Min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 mL Cellwash hinzugegeben und danach bei 300 g für 5 Min bei RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurden 250 μL Cellwash in die Röhrchen pipettiert und die Proben gemessen. Die Werte für CD107⁺ Zellen sind als Prozentanteil von NK-Zellen angegeben.

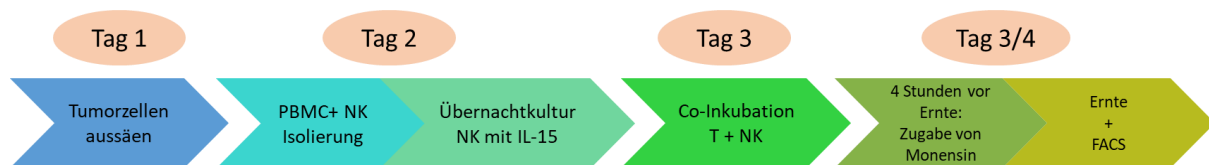


Abbildung 11: Überblick über den Versuchsablauf der Degranulationsanalyse mittels FACS. Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die NK-Zell-Isolierung und übernacht IL-15-Kultivierung. Am darauffolgenden Tag werden die Tumorzellen (T) mit den NK-Zellen (NK) koinkubiert. Vier Stunden vor der Ernte erfolgt eine Zugabe von Monensin und eine durchflusszytometrische Analyse mittels FACS wird durchgeführt.

Tabelle 18: Antikörpermix für 3-fach Färbung während des Degranulations Assays

Antikörper	Kanal	Menge pro Tube
CD56	PE	5 μL
CD3	FITC	10 μL
CD45	V500	5 μL

3.2.15 Durchflusszytometrische Analysen der Zytotoxizität: Vorversuch Chemotherapeutika in 2D

Für die Vorversuche der Zytotoxizitätstests nach Chemotherapie wurden die Versuche nach Abbildung 12 und Tabelle 19 durchgeführt. Die Vorversuche dienten dem Zweck, die Autofluoreszenz der Chemotherapie-Substanzen zu lokalisieren und eine geeignete Gating-Strategie zu finden. Die Versuche liefen nach dem gleichen Schema wie die AnnexinV/7-AAD-Versuche, mit dem Unterschied, dass 24 Stunden nach der Aussaat der Tumorzellen die Chemotherapie-Substanzen in die entsprechenden Wells mit entsprechender Konzentration (siehe Tabelle 20) dazu gegeben wurden. Am darauffolgenden Tag (nach 24 Stunden) wurde das Medium in ein FACS-Röhrchen überführt. Die adhärennten Tumorzellen im Well wurden mit 0,5 mL PBS gewaschen

und anschließend mit 0,5 mL Trypsin für 5 Min im Inkubator inkubiert. Nachdem die Tumorzellen abgelöst waren, wurde das Trypsin, mit dem sich im FACS-Röhrchen befundenen Medium neutralisiert und die komplette Zellsuspension konnte in das FACS-Röhrchen überführt werden. Nach der Ernte der Zellsuspension wurden die Zellen 5 Min bei RT und 300 g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde in jedes FACS-Röhrchen 2 mL Cellwash (4 °C) hinzugefügt und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation bei RT und 300 g für 5 Min wurde der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von 100 µL Cellwash, wurden zu den FACS-Röhrchen für die Färbungen 5 µL CD45 (V500) hinzugefügt und alle Röhrchen gevortext. 2 mL Cellwash wurde nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT in jedes Röhrchen gegeben und anschließend wurden alle Tubes bei 4 °C und 300 g für 5 Min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, kamen alle FACS-Röhrchen auf ein Kühl-Rack. Hinzugefügt wurden 100 µL von 4 °C kaltem Binding Buffer und anschließend wurden die Röhrchen gevortext. Danach wurden der Zellsuspension 5 µL 7-AAD und 5 µL AnnexinV hinzugegeben und im Dunkeln bei RT für 15 Min inkubiert. Nachfolgend wurde jedes FACS-Röhrchen mit weiteren 100 µL Binding Buffer versehen und sofort bzw. innerhalb von 30 Min gemessen. So konnte die Tumor- und NK-Zell-Viabilität mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden. Die Werte für apoptotische bzw. nekrotische Zellen sind als Prozentanteil von Tumorzellen angegeben.



Abbildung 12: Vorversuch zur Chemotherapie-Behandlung: Überblick über den Versuchsablauf Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die Zugabe des Chemotherapeutikums in die Platten. Nach 24-stündiger Behandlung erfolgte am nächsten Tag die Ernte und FACS-Messung.

Tabelle 19: Antikörpermix für 3-fach Färbung während 7-AAD/AnnexinV-Färbung bei Vorversuch für die Chemotherapie-Behandlung

Antikörper	Kanal	Menge pro Tube
AnnexinV	APC	5 µL
7-AAD	perCP	5 µL
CD45	V500	5 µL

Tabelle 20: Chemotherapiekonzentration pro Well bei Vorversuch

Chemotherapeutikum	Menge pro Well (2 mL)
Cisplatin	1,5 μ M
Etoposid	1,5 μ M

3.2.16 Durchflusszytometrische Analysen der PVR-Expression auf Tumorzellen

3.2.16.1 Durchflusszytometrische Analysen, Isotypenkontrolle, Antikörper-Titration, Fluoreszenzüberstrahlung und Gating-Strategie für CD155 (PVR)

Da es sich um einen neu erworbenen und erstmals verwendeten Antikörper in unserem Labor handelte, wurde zunächst eine Validierung durch Isotypen und Bestimmung der optimalen Antikörpermenge durchgeführt (vgl. Anhang Abbildung 49 A und Abbildung 50 A). Durch eine Isotypenkontrolle kann eine unspezifische Bindung von Antikörpern an die Zellen detektiert werden und so entstehenden Hintergrundsignale abgeschätzt werden. Hierzu werden Antikörper verwendet, die denselben Isotyp des Immunglobulins, des zu testenden Antikörpers, entsprechen, aber gegen ein Antigen gerichtet sind, die auf den zu untersuchenden Zellen nicht exprimiert sind. Es sollte darum vom selben Isotyp und derselben Spezies, ebenfalls an die gleichen Fluorochrome gekoppelt sein und zusätzlich in der gleichen Konzentration eingesetzt werden (Hulspas et al., 2009).

Bei der Durchführung wurde sowohl der Antikörper als auch der Isotyp mit 0,5 μ L, 1 μ L und 2,5 μ L getestet. 1 Mio. Tumorzellen wurden in FACS-Röhrchen überführt und bei 330 g 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde danach abgekippt und 2 mL Cellwash hinzugegeben. Anschließend wurden die Röhrchen gevortext. Nach einer erneuten Zentrifugation (300 g, 10 Min, RT) wurde der Überstand erneut abgekippt und 100 μ L Cellwash in jedes Röhrchen gegeben. Danach wurde der Antikörper bzw. der Isotyp, wie oben beschrieben, in verschiedenen Konzentrationen hinzugegeben und 20 Minuten im Dunkeln bei RT inkubiert. Danach wurden 2 mL Cellwash hinzugefügt und die Proben gevortext. Nach einer erneuten Zentrifugation (350 g, 5 Min, RT), wurde der Überstand abgeschüttet und das Pellet durch vortexen mit 2 mL Cellwash resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut zentrifugiert für 5 Min 350 g bei RT. Der Überstand wurde verworfen und 250 μ L Cellwash in jedes Röhrchen hinzugegeben. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo.

Bei Tumorzellen, die allein im Well waren, wurden diese erst gewaschen und dann trypsiniert. Alle Überstände wurden zum Stoppen des Trypsins verwendet und dann ebenfalls in die FACS-Röhrchen überführt. Tumorzellen in Koinkubation (über 2 Stunden) konnten ohne Trypsin überführt werden. Nach der Ernte der zu untersuchenden Zellen bzw. der Zellsuspension wurden die Zellen in FACS-Röhrchen

überführt und 10 Min bei RT und 300 g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde in jedes FACS-Röhrchen 2 mL PBS hinzugefügt und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation bei RT und 300 g für 5 Min wurde der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von 100 µL PBS, wurden den FACS-Röhrchen für die Färbungen 10 µL einer 1:1000 Zombie Violet-Verdünnung hinzugefügt und alle Röhrchen gevortext. 2 mL Stain Buffer wurde nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT in jedes Röhrchen gegeben und anschließend wurden alle Tubes bei RT und 330 g für 5 Min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, kamen 100 µL Cellwash in jedes Röhrchen. Darauf folgte CD45-, PVR und ISO-Färbung (nach Tabelle 21) und anschließend wurden die Röhrchen gevortext. Danach wurden die Tubes im Dunkeln bei RT für 15 Min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 2 mL Cellwash, vortexen und erneutes fünfminütiges Zentrifugieren bei 300 g und RT. Nachfolgend wurden die Röhrchen wieder abgekippt und mit weiteren 250 µL Cellwash versehen und gemessen. So konnte der CD155 Oberflächenmarker auf den lebenden Tumorzellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden. Eine Antikörpermenge von 25 ng war in beiden Ziellinien, TY82 und HepG2, ausreichend, um eine spezifische Färbung zu erzielen.

Tabelle 21: Antikörpermix für Färbung während PVR-Versuchen

Antikörper	Kanal	Menge pro Tube
Zombie Violet 1:1000	APC	10 µL
PVR (CD155)	PE	0,5 µL
CD45	APC	10 µL
Isotypenkontrolle	PE	0,5 µL

Während der Durchführung einer simultanen, mehrfarbigen Fluoreszenzanalyse mittels des Durchflusszytometers kann es zu Problemen von Überlappungen kommen. Eine so genannte Fluoreszenzüberlappung, bei der Fluorochrome in benachbarte Detektionskanäle Signale erzeugen können und so Ergebnisse verfälschen. Um dies auszuschließen, testeten wir den Antikörper CD155, detektiert im PE-Kanal, in einem weiteren Schritt auf eine eventuelle Strahlung in andere Kanäle. Bei einer Konzentration von 25 ng strahlte der CD155-Farbstoff nicht in weitere Kanäle. Dies konnte sowohl bei der Zelllinie TY82 (Anhang Abbildung 49 B) als auch in der Tumorzelllinie HepG2 (Anhang Abbildung 50 B) nachgewiesen werden.

Zur besseren Identifikation und Separierung lebender Tumor- und Immunzellen, wurde in dieser Versuchsreihe (PVR-Experimente) eine optimierte Gating-Strategie verwendet (siehe Abbildung 13). Zur Einteilung der Zellen in verschiedene Populationen (Tumor und NK-Zellen), wurde nach jeder durchflusszytometrischen Messung, mithilfe der Software FlowJo, eine Gating-Strategie angewendet, mittels der sich die Tumorzellen und die NK-Zellen gut voneinander in der Koinkubation

identifizieren und trennen ließen. Dabei wurden zunächst alle zu untersuchenden Zellen in einem Diagramm dargestellt, bei dem das gemessene Signal FSC-H gegen das Signal FSC-A aufgetragen wurde. In diesem Diagramm wurde das Gate so positioniert, dass nur einzelne Zellen (Singlets) miteingeschlossen wurden, Dubletten und Aggregate wurden ausgeschlossen. Die im Gate vorhandenen Zellen wurden in einem weiteren Diagramm dargestellt, bei dem das Signal SSC-A gegen das Signal APC (CD45) aufgetragen wurde. In einer ungefärbten NK-Probe wurde nun ein weiteres Gate für die CD45 negativen Zellen gesetzt. Dies stellte die Tumorphopulation dar. Diese Methode ermöglichte eine zuverlässige Trennung der Tumor- von den NK-Zellen innerhalb der Koinkubation. Anschließend wurde ein weiteres Gate um die zuvor identifizierten Tumorzellen gelegt, um diese hinsichtlich ihrer Expression von Zombie Violet (BV421) zu untersuchen. Zombie Violet positive Zellen gelten als nicht vital und wurden daher aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Das Gate wurde gezielt auf die Zombie Violet⁻-Zellen (linksseitig im Diagramm) gelegt. Diese ausgewählten lebenden Zellen wurden hinsichtlich ihrer Expression des Oberflächenmoleküls CD155 untersucht. Um das Ausmaß der jeweiligen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe pro Partikel in einer Zellpopulation zu bestimmen, wurde für jeden Expressionswert auch die mediane Fluoreszenzintensität (MeFI) berechnet. Ein Beispiel dieser Vorgehensweise ist in Abbildung 13 dargestellt.

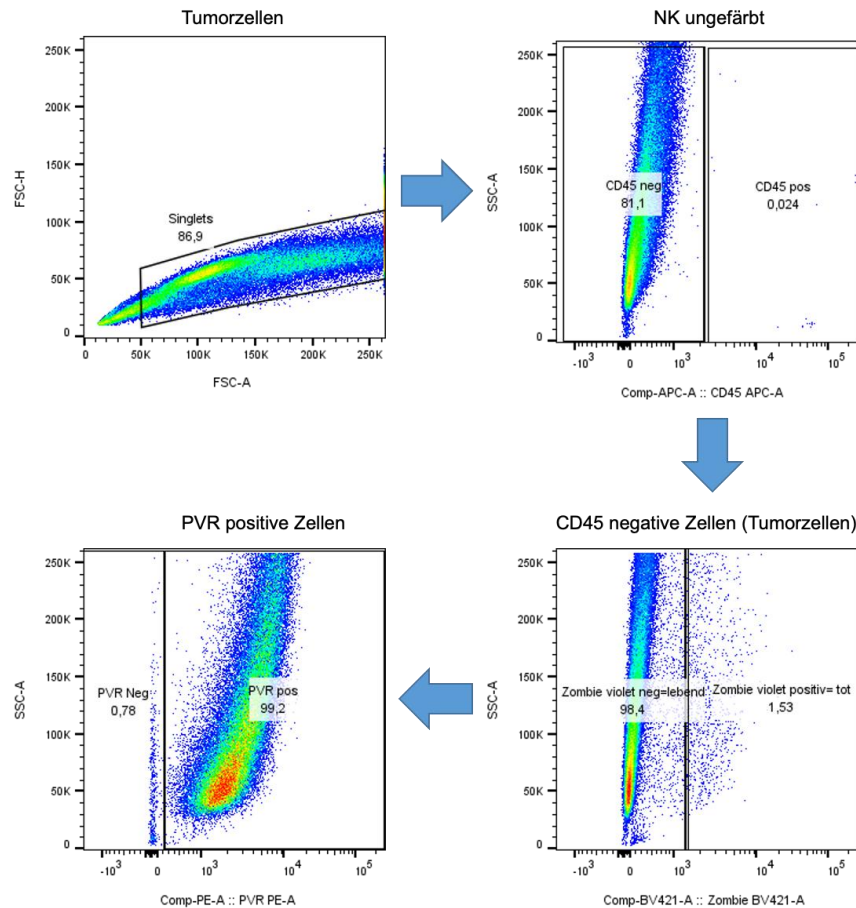


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der Koinkubation von Tumorzellen und NK-Zellen mit entsprechender Gating-Strategie. HepG2-Zellen wurden mit NK-Zellen inkubiert, um die PVR-Expression der lebenden Tumorzellen zu bestimmen. Zunächst wurden die Signale FSC-H gegen FSC-A aufgetragen, wodurch die Singlets erhalten wurden. Diese wurden anschließend hinsichtlich des Signals SSC-A in Abhängigkeit von APC-CD45 aufgetragen, um die CD45 negativen Zellen (Tumorzellen) zu erhalten. Durch Auftragung der Tumorzellen gegen SSC-A und Zombie Violet (BV421) konnten die lebenden Tumorzellen identifiziert werden. Diese Zellen wurden dann auf eine PVR-Positivität hin untersucht.

3.2.16.2 Durchflusszytometrische Analysen von PVR nach Chemotherapie-Behandlung

Für die Zytotoxizitätstests nach Chemotherapie und PVR-Analyse wurden die Versuche nach Abbildung 14 und Tabelle 21 durchgeführt. Die Experimente folgten demselben Ablauf wie die vorherigen Versuchsreihen, mit dem Unterschied, dass 24 Stunden nach der Aussaat der Tumorzellen die Chemotherapie-Substanzen gemäß Tabelle 22 in die entsprechenden Wells und Konzentrationen für eine Dauer von 24 Stunden zugegeben wurde. Danach wurde das Medium im Well abgesaugt und die Tumorzellen 2x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die NK-Zellen entsprechend Tabelle 15 hinzugegeben. Nach der Koinkubation wurden die Tumorzellen geerntet. Tumorzellen allein mussten erst gewaschen und dann trypsiniert werden. Zellen in der Koinkubation lösten sich auch nach 2 Stunden schon

ohne Trypsin vom Wellboden ab. Nach der Ernte wurde die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt und 10 Min bei RT und 300g abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgekippt wurde, wurde in jedes FACS-Röhrchen 2 mL PBS hinzugefügt und gevortext. Nach erneuter Zentrifugation bei RT und 300 g für 5 Min wurde der Überstand abgekippt. Nach Zugabe von 100 µL PBS in alle Röhrchen, wurden den FACS-Röhrchen für die Färbungen 10 µL einer 1:1000 Zombie Violet-Verdünnung hinzugefügt und alle Röhrchen gevortext. 2 mL Stain Buffer wurde nach einer 15-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT in jedes Röhrchen gegeben und anschließend wurden alle Tubes bei RT und 330 g für 5 Min zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, kamen 100 µL Cellwash in jedes Röhrchen. Darauf folgte CD45-, PVR-, ISO-Färbung nach Tabelle 21 und anschließend wurden die Röhrchen gevortext. Danach wurden die Tubes im Dunkeln bei RT für 15 Min inkubiert. Es folgten 2 mL Cellwash, vortexen und erneutes fünfminütiges zentrifugieren bei 300g und RT. Nachfolgend wurden die Röhrchen wieder abgekippt und mit weiteren 250 µL Cellwash versehen und gemessen. So konnte die Tumor- und NK-Zell-Viabilität und PVR (nach Chemotherapie-Behandlung) mittels Durchflusszytometrie identifiziert werden.

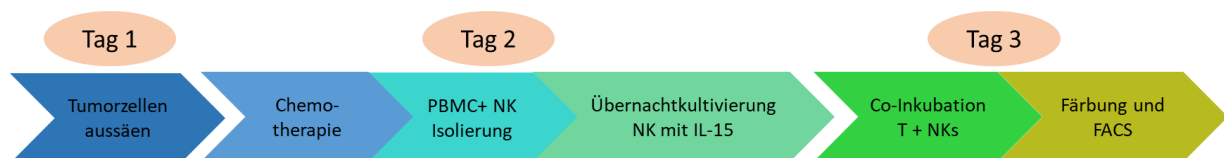


Abbildung 14: Überblick über den Versuchsablauf während des Versuchs zur Chemotherapie Behandlung und anschließender Viabilität- und PVR-Messung. Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die Zugabe des Chemotherapeutikums und die NK-Zell-Isolierung mit übernacht IL-15-Kultivierung. Am darauffolgenden Tag werden die Tumorzellen (T) mit den NK-Zellen (NK) koinkubiert. Danach folgt die Ernte der Zellen und eine durchflusszytometrische Analyse mittels FACS.

Tabelle 22: Chemotherapiekonzentration pro Well mit anschließender PVR- und Zombie Violet-Färbung

Chemotherapeutikum	Menge pro Well (2 mL)
Cisplatin	100 nM
Etoposid	100 nM

3.2.17 Durchflusszytometrische Analysen der Zytotoxizität des PARP-Inhibitors Olaparib

Um die Wirkungsweise des PARP-Inhibitors Olaparib untersuchen zu können, wurden die Tumorzellen für 4 Stunden bzw. 24 Stunden mit Olaparib behandelt. Dazu wurden die Tumorzellen einen Tag vorher in 12-Well-Platten in bekannter Konzentration (siehe Tabelle 14) eingesät. Nach der Behandlung wurde der Überstand abgesaugt und die

adhärenten Zellen 2 x mit PBS (1 mL) gewaschen. Direkt im Anschluss wurden die NK-Zellen für eine Koinkubation im Verhältnis 1:10 darauf gegeben. Diese blieben, je nach Versuch, 4-24 Stunden auf den Tumorzellen. Danach wurde das Protokoll für einen CD107a-Versuch bzw. 7-AAD/AnnexinV-Versuch, wie in Kapitel 3.2.13 und 3.2.14 ersichtlich, durchgeführt.



Abbildung 15: Überblick über den Versuchsablauf während der Olaparib-Behandlung. Beispielhaft wurde hier eine Olaparib-Behandlung von 24h dargestellt. Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die Zugabe des Chemotherapeutikums Olaparib und die NK-Zell-Isolierung mit übernacht IL-15-Kultivierung. Am darauffolgenden Tag werden die Tumorzellen (T) mit den NK-Zellen (NK) koinkubiert. Danach folgt die Ernte der Zellen und eine durchflusszytometrische Analyse mittels FACS.

3.2.18 Durchflusszytometrie: Einstellungen und Auswertung der Daten

Zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden pro Messung 50.000 bzw. 100.000 kernhaltige Zellen gemäß FSC-SSC-Blot gezählt (siehe Tabelle 23).

Sowohl das Mess-File, als auch das Auswerte-File wurde von der Firma BD Biosciences eingerichtet. Die Werte für die zu untersuchenden Zellen wurden prozentual angegeben.

Tabelle 23: Anzahl der unterschiedlichen Zellearten, die im FCS-SSC-Blot gezählt werden mit verschiedenen Gates

Zelltyp	unstimuliert	Stimuliert (3x)	Gate
NK	100.000	100.000	All Events
Tumorzellen	100.000	100.000	All Events
NK+Tumorzellen	30.000	50.000	Tumorgate/- CD45(-)-Gate

Die Auswertungen und die Erstellung der zugehörigen Abbildungen erfolgten am Computer mit Hilfe der Software FlowJo. Diagramme und statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 7 durchgeführt. In FlowJo wurden uns die gemessenen Werte in zweidimensionalen Diagrammen angezeigt, mit je einem Parameter auf der x- bzw. y-Achse. So ist eine im FACS gemessene Zelle entweder positiv oder negativ für einen gemessenen Parameter. Durch eine zuvor gemessene ungefärbte Probe wurde festgelegt, ab welchem Wert ein Parameter als positiv gezählt wird. Man erstellt

sogenannte Quadranten. Der linke untere Quadrant zeigt Zellen an, die für beide Parameter negativ sind. Der obere rechte Quadrant enthält für beide Eigenschaften positive Zellen. So lassen sich graphisch verschiedene Populationen zeigen und abgrenzen. Die Zellen können so anhand noch weiterer Kriterien und Parameter charakterisiert und weiter eingekreist werden. Dieses Vorgehen bezeichnet man als „Gating“ (Herzenberg et al., 2006; Tung et al., 2007). Über das Gating kann man spezielle Aussagen über bestimmte Teilpopulationen machen, in unserem Fall mussten die Tumorzellen und NK-Zellen gut voneinander abgegrenzt werden und tote Zellen oder Zellschrott ausgeschlossen werden. Angegeben werden kann die absolute Zellzahl, oder wie in den meisten unserer Fälle, war die Anzahl der Zellen in diesen Subpopulationen in Prozent der Gesamtzellzahl gezeigt. Die einzelnen Zellen können graphisch in Plots dargestellt werden.

3.2.19 Bestimmung der zelllinien-spezifischen Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Etoposid und Cisplatin (Chemotherapie Positivkontrolle)

Um die Wirkungsweise des Chemotherapeutikums Etoposid und Cisplatin zu bestätigen, wurde die individuelle Sensitivität gegenüber Etoposid und Cisplatin für jede Zelllinie in Tabelle 24 ermittelt. Die Zelllinie A549, die für ihre hohe Sensitivität gegenüber Etoposid bekannt ist, wurde ergänzend als weitere Positivkontrolle eingesetzt. Beim Erstellen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ist es notwendig, dass die Zellen in der 12-Well-Platte über die gesamte Zeitspanne des Versuchs exponentiell wachsen können und genug Platz haben. Dies ist besonders für die unbehandelte Kontrollreihe von großer Bedeutung, da sie der Bezugspunkt zu späteren Aussagen herstellt. Da alle drei verwendete Zelllinien unterschiedliche Wachstumseigenschaften aufweisen, wurde für jede Zelllinie im Vorfeld eine spezifische Zellzahl ermittelt, welche zu Beginn des Versuches in die Wells eingesät wurden. Nach 24 und 48 Stunden wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, aus den Wells gelöst und gezählt. So wurde die jeweilige Zellzahl pro Zelllinie ermittelt, bei der ein exponentielles Wachstum über den gesamten Zeitraum des Versuches beobachtet werden konnte (siehe Tabelle 24). Für die Behandlung der Zelllinien mit Etoposid wurden die Zelllinien in entsprechender Menge (siehe Tabelle 24) eingesetzt und über Nacht im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit verschiedenen Chemo-Konzentrationen (50 nM, 100 nM, 250 nM) behandelt. Zusätzlich wurde eine DMSO/NaCl-Kontrolle mitgeführt. Hierzu wurde das komplette Medium im Well mit einer entsprechenden Etoposid- Konzentration oder NaCl-Kontrolle ausgetauscht. Da Etoposid bei 37 °C nicht länger als 24-30 Stunden stabil ist, wurde für den Versuch über 48 Stunden das Chemotherapeutikum nach 24 Stunden erneuert. Nach 24 und 48 Stunden der Behandlung wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.2 und 3.2.3 beschrieben, gewaschen, mit Trypsin gelöst und im Anschluss gezählt.

Tabelle 24: Anzahl der Zellen unterschiedlicher Zelllinien in einer 12-Well-Platte für Chemo-Positiv-Kontrolle

Zelltyp	Medium/Well	Anzahl Zellen/Well
TY82	2 mL	300.000
HepG2	2 mL	200.000
A549	2 mL	80.000

3.2.20 ApoTox-Glo™ Triplex Assay

Um die zytotoxischen Effekte der Koinkubation von Tumor- und NK-Zellen weiter zu analysieren, wurde der ApoTox-Glo™ Triplex Assay durchgeführt. Dieser Assay ermöglicht es, drei verschiedene Komponenten, nämlich Viabilität, Zytotoxizität und Apoptoseinduktion, simultan zu messen und zu analysieren. Dabei werden im ersten Durchlauf zwei Proteaseaktivitäten simultan gemessen. Bei der Messung der Viabilität wird das Substrat GF-AFC (Glycyl-Phenylalanylaminofluorocoumarin), das in viable Zellen eindringen kann, von einer intrazellulär exprimierten Protease in das fluoreszierende AFC gespalten. Die Menge des Fluoreszenzsignales korreliert mit der Anzahl der lebenden Zellen, da die intrazellulär spaltende Protease bei Integritätsverlust der Zelle auch die Enzymaktivität verliert. Die zweite Messung dient der Detektion von toten, nicht mehr intakten Zellen. Hierzu wird zu der Zellsuspension das Substrat bis-AAF-R110 (Bis-Alanylalanyl-Phenylalanyl-Rhodamine 110) hinzugefügt. Dieses Substrat kann nicht in lebende Zellen eindringen, wird aber von einer Protease gespalten, die Zellen während ihres Zelluntergangs freisetzen. Das Spaltprodukt R110 ist ebenfalls fluoreszent. Beide Spaltprodukte, AFC und R110 haben unterschiedliche Exzitations- und Emissionsspektren und können somit parallel am Gerät gemessen werden. In einem zweiten Schritt wird mit den gleichen Zellen die Apoptose mit Caspase 3 und 7 gemessen. Die Aktivität dieser beiden Caspasen ist proportional zur Apoptoseinduktion. Zuerst erfolgt eine Lyse der Zellen, danach wird das hinzugegebene Substrat DEVD-Tetrapeptid durch die Caspasen 3 und 7 gespalten. Das Spaltprodukt dient einer Luciferase als Substrat. So entsteht ein Luciferasesignal, das durch das Luminometer gemessen werden kann. In Vorversuchen wurde für jede Zelllinie getestet, wie viele Zellen einzusäen sind, um nach zwei Tagen eine 80-85% Konfluenz in den 96er Wells zu erreichen (siehe Tabelle 25). Bei diesem Versuch wurden sowohl Wasser-Kontrollen als auch positive und negative Kontrollen mitgeführt. Zu diesen gehörten unter anderem: „No-Cell-Control“ und „Untreated-Cells-Control“. Hier wurde nur das Medium allein und unbehandelte Zellen gemessen. Als positive Kontrollen zählten unter anderem: Zellviabilität und Zytotoxizität. Hier wurde Digitonin 15 Minuten vor Ende des Versuchs hinzugefügt (30 µg/mL). Die Nekrose-Kontrolle wurde mit Ionomycin durchgeführt. Dieses bleibt für 4 Stunden mit einer Konzentration von 100 µM im Well. Staurosporin wurde für die Apoptosekontrolle verwendet und für 24 Stunden mit den Tumorzellen inkubiert. Die Konzentration betrug 1 µM pro Well. Die entsprechende Zellzahl wurde an Tag 1 mit

100 µL Medium eingesät und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 24 Stunden mit Chemotherapie behandelt, wobei darauf geachtet wurde, dass nur 10 µL Chemotherapie-Substanz in jedes Well gegeben wurde. Davor wurden 10 µL Medium aus jedem Well entfernt. In den Wells in die keine Chemotherapie-Substanzen hinzugegeben wurden, wurde 10 µL Standard-Medium ausgetauscht. Nach der Zugabe von NK-Zellen an Tag 3 (siehe Abbildung 16) und der Koinkubation der Zellen erfolgte der ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Hierzu wurden 20 µL des zuvor angemischten Viability/Cytotoxicity Reagenzes dazu gegeben und durch vorsichtiges auf und ab pipettieren gemischt. Anschließend wurde die 96-Wellplatte für 30 Sekunden auf einen Kreisschüttler gestellt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach folgte die Fluoreszenzmessung mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen: Die Viabilität wurde bei 400Ex/505Em und die Zytotoxizität bei 485Ex/520Em gemessen. Nachfolgend wurden 100 µL des Caspase-Glo® 3/7 Reagenzes in jedes Well gegeben. Es folgten erneut 30 Sekunden auf dem Kreisschüttler mit anschließender 30-minütiger Inkubation bei RT. Direkt im Anschluss wurde am Tecan die Lumineszenz gemessen (Promega, 2015).

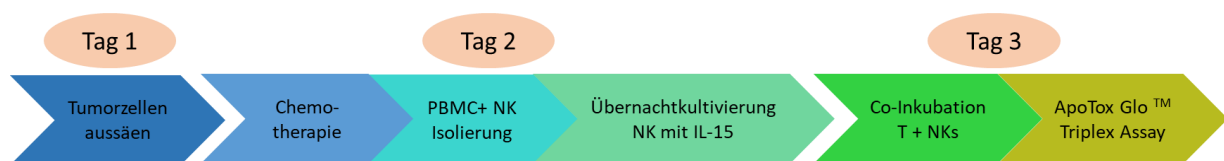


Abbildung 16: ApoTox Glo™ Triplex Assay: Überblick über den Versuchsablauf mit Chemotherapie. Die Tumorzellen werden in die Platten eingesät, am nächsten Tag folgt die Zugabe des Chemotherapeutikums und die NK-Zell-Isolierung mit übernacht IL-15-Kultivierung. Am darauffolgenden Tag werden die Tumorzellen (T) mit den NK-Zellen (NK) koinkubiert. Danach folgt die Analyse mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay.

Tabelle 25: Anzahl der Zellen in 96-Well-Platten pro Well mit Volumen pro Well

Zelltyp	Medium/Well	Anzahl Zellen/Well
TY82	200 µL	40.000
HepG2	200 µL	100.000

3.2.21 CellTiter-Blue® Cell Viability Assay

Für verschiedene Medikamenten-Titrations wurde der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von Promega zur fluorimetrischen Messung der Viabilität der Tumorzellen verwendet. In diesem Versuch wird Resazurin zur Hilfe genommen, das ein Indikator für Zellviabilität darstellt. Viable Zellen können Resazurin in das fluoreszente Resorufin umwandeln, wohingegen nicht-viable Zellen dazu nicht in der Lage sind und so kein

Fluoreszenz-Signal entstehen kann. Nähere Angaben zum Versuchsablauf sind in Abbildung 17 zu entnehmen. Zwei Tage vor der eigentlichen Messung wurden die Tumorzellen in der entsprechenden, vorher für den Versuch getesteten, Konzentration (siehe Tabelle 14) in die Platten (siehe Tabelle 6) gesät. Die Mediummenge pro Well betrug 100 µL. Um später die Hintergrundfluoreszenz subtrahieren zu können, wurden außerdem zellfreie Inkubationsansätze bzw. Mediumansätze vorbereitet. Den Zellen wurde über Nacht die Möglichkeit gegeben, in den Platten anzuwachsen. Am Tag zwei erfolgte die Zugabe des zu testenden Medikamentes in verschiedenen Konzentrationen. Nach Ablauf einer ausgewählten Zeitperiode begann der eigentliche CellTiter-Blue® Cell Viability Assay. Hierzu wurden 20 µL des zuvor im Wasserbad auf 37 °C erwärmtem Cell Titer Blue -Reagenzes in jedes Well gegeben, 10 Sek. geschüttelt und 3 Stunden im Inkubator bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit von 3 Stunden wurde in einem Vorversuch als optimal ermittelt. Nach drei Stunden Inkubationszeit wurden die Platten erneut für 10 Sek. geschüttelt. Anschließend wurden die Platten in den Fluorometer zum Messen gestellt. Die vom Hersteller empfohlenen Messangaben wurden von uns noch weiter optimiert, so dass wir mit einer Exzitation von 540 und einer Emission von 600 und Z-Position von 3000 gemessen haben. Bei der Auswertung wurde die Hintergrundfluoreszenz zellfreier Proben bestimmt und von den Proben subtrahiert. Da wir unterschiedliche Zelllinien verwendeten und jede Zelllinie in der Lage ist, unterschiedliche Signalverhalten aufzuweisen und zusätzlich auf die verwendeten Medikamente verschieden reagieren, wurde dieser Versuch für alle Zelllinien separat wiederholt.

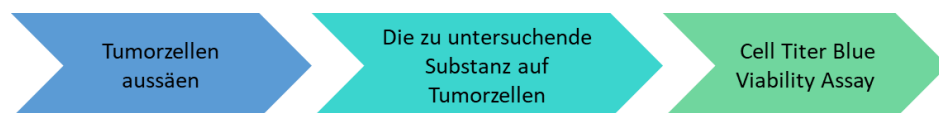


Abbildung 17: CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von Promega. Überblick über den Versuchsablauf. Als erstes werden die Tumorzellen in die Wells eingesät, am nächsten Tag folgt die Zugabe der Substanz, die untersucht werden soll, auf die Tumorzellen. Im Anschluss wird mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays die Viabilität der Zellen analysiert.

3.2.22 Multiplex Assay

Die Multiplex Assays sind ein Analyseverfahren, die mithilfe von Beads viele Analyten gleichzeitig aus einer auch sehr geringen Menge an Probe, in diesem Fall aus Zellkulturüberständen, messen bzw. sie quantifizieren können (Khalifian et al., 2015). Die für diesen Versuch verwendeten Materialien und Milliplex® Assays können in Kapitel 3.1.6 entnommen werden.

Nach dem Auftauen der Proben wurden die Zellkulturüberstände zunächst bei 1000 x g für zehn Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurden die mit Antikörper markierten, immobilisierten Beads vorbereitet. Dazu wurde jedes dazugehörige Vial für 30 s in einem Ultraschall-Wasserbad gestellt und für 1 Min gevortext. Im Anschluss

wurden die Qualitätskontrollen 1 & 2 mit 250 µL deionisiertem H₂O angesetzt, invertiert und gevortext und dann 5-10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Zudem wurden 60mL des 10 X Wash Buffer mit 540 mL deionisiertem H₂O verdünnt. Zur Vorbereitung der Standardreihe als Kalibrierung des Immunoassays wurde das Reagenz Human CD8+ T-Cell Standard (oder Human Sepsis Magnetic Bead Panel 1) in 250 µL deionisiertem H₂O gelöst, invertiert, für 10 s gevortext und 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde eine Standardreihe aus 7 Verdünnungen hergestellt. Das hergestellte Reagenz dient hierbei als Standard 7. In 6 weiteren Eppendorfröhrchen wurden jeweils 150 µL Assay Buffer vorgelegt, daraufhin 50 µL der Stock-Standardlösung entnommen und in das nächste Eppendorf Tube mit den 150 µL Assay Buffer vermischt. Das Ganze wurde gut durch Vortexen vermischt. Von dort wurden wieder 50 µL in das nächste Röhrchen überführt und das Procedere wiederholte sich, sodass eine serielle Verdünnung entstand. Alle Reagenzien wurden auf Raumtemperatur temperiert, bevor sie für den Assay verwendet wurden. Nach dieser Vorbereitung wurden zu Beginn jedes Immunoassays 200 µL Assay Buffer in jedes Well der 96-Well-Platte gegeben und diese für 30 Min bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Dekantieren des Assay-Buffers wurden 25 µL der Standardlösung in die entsprechenden Wells pipettiert und es wurden 25 µL Assay-Buffer in die Wells der Proben hinzugegeben. Danach folgten 25 µL Matrix Solution in die Wells für den Hintergrund (Background), die Standardreihe und die Kontrollen vorgelegt. Dann folgten 25 µL der jeweiligen Zellkulturüberstände. Zuletzt wurden in jedes Well 25 µL von der Mischung der Beads gegeben und über Nacht (16-18 Stunden) bei 4 °C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte zweimal mit 200 µL Wash Buffer gewaschen. Danach wurden jeweils 25 µL Detektions-Antikörper in jedes Well hinzugegeben und die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach dieser Zeit wurde ohne Aspiration der Inhalte der Wells 25 µL Streptavidin-Phycoerythrin pro Well hinzugegeben, eine Folie auf die 96-Well Platte geklebt und die Platte für 30 Min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Inhalte der Wells abgenommen und jedes Well zweimal mit 200 µL Wash Buffer gewaschen. Nach Zugabe von 150 µL Drive Fluid pro Well wurden die Beads in den Wells für 5 Min schüttelnd resuspendiert und am Analysegerät MAGPIX® System gemessen bzw. analysiert.

Die Ergebnisse wurden mit der MAGPIX®-Software MILLIPLEX Analyst® ausgewertet. Die Fluoreszenzintensität, welche durch das MAGPIX-Gerät bestimmt wird, kann dann durch diese Analysesoftware in eine Konzentration des jeweiligen Analyten umgerechnet werden. Jedes Bead wurde mit einem Farbstoff gekoppelt und kann so im Nachgang durch die MAGPIX-Software eindeutig einem Analyten zugeordnet werden. Zur Qualitätssicherung der Messungen wurde in diesem Assay die Konzentration der Immun-Checkpoint-Proteine jedes Zellüberstandes in zwei verschiedenen Wells auf der 96-Well-Platte gemessen. Es handelt sich hierbei also um technische Doppelbestimmungen. Die bei jeder Messung zusätzlich zu den Proben gemessenen Qualitätskontrollen des Herstellers ermöglichen eine spätere Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Messungen.

3.2.23 Statistische Auswertungen

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der GraphPad Prism Software. Die Fehlerbalken repräsentieren die mediane Standardabweichung vom Mittelwert. Bei allen Auswertungen und Analysen wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ als Schwellenwert festgelegt. Die Daten wurden mit folgenden Tests parametrisch analysiert: Students t-Test, einfaktorieller one way ANOVA mit Greenhouse-Geisser Korrektur und Tukey's multiple comparison test oder zweifaktorieller Varianzanalyse mittels Two Way ANOVA.

4 ERGEBNISSE

4.1 2D-Versuche der Koinkubation von Tumorzelllinien und NK-Zellen

4.1.1 Zunahme der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität nach Koinkubation mit Tumorzellen

Zu Beginn der Versuchsreihe mit dem Ziel, die Interaktion zwischen Tumorzellen und NK-Zellen im Rahmen eines Koinkubationsmodells zu analysieren, erfolgte zunächst das Einsetzen der Tumorzellen gemäß Abschnitt 3.2.13, gefolgt von der gemeinsamen Kultivierung mit NK-Zellen.

Abbildung 18 zeigt lichtmikroskopische Aufnahmen während der Kultivierungsphase, sowohl von den Tumorzellen als auch von NK-Zellen allein. Die morphologischen Unterschiede der drei Zelltypen waren deutlich zu erkennen: Die Tumorzelllinie TY82 bildete kleine kompakte und zusammenhängende Zellaggregate, die HepG2-Zellen erschienen als größere flächig wachsende Zellverbände. NK-Zellen erschienen eher rund und waren deutlich kleiner als Tumorzellen.

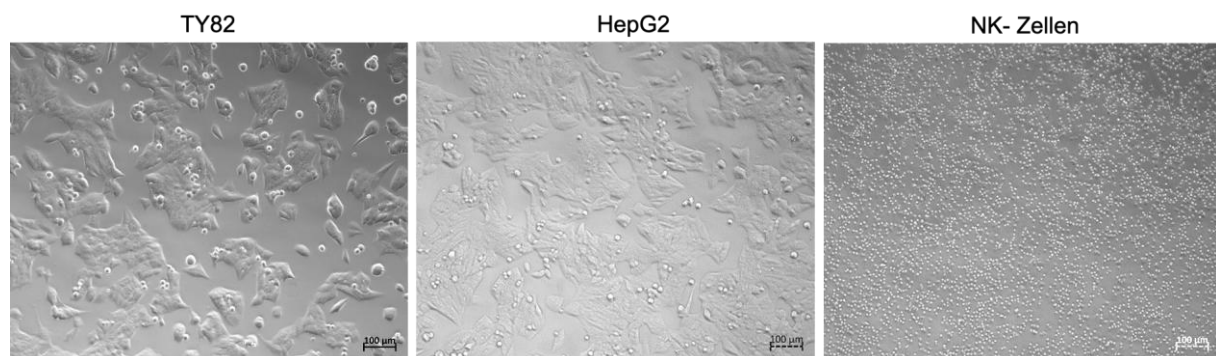


Abbildung 18: Mikroskopische Aufnahmen der verwendeten Tumorzelllinien TY82 und HepG2 und NK-Zellen. Maßstab 100 µm.

Nach der Koinkubation von 48 Stunden bzw. 96 Stunden konnten die Zellen geerntet und anschließend mit AnnexinV und 7-AAD gefärbt werden. Abbildung 19 A stellt die Ergebnisse für TY82-Zellen dar, welche als besonders resistente Ziellinie gegenüber Chemotherapeutika gelten. Bei den Tumorzellen allein betrug die Zell-Viabilität nach 48 Stunden etwa 80%, nach 96 Stunden noch etwa 70%. Der Anteil früh- und spät-apoptotischer Zellen sowie der nekrotischen Zellen lag jeweils bei 10%. Im deutlichen Kontrast dazu zeigte sich das Bild nach Koinkubation mit NK-Zellen: Bereits nach 48 Stunden und 96 Stunden sank die Viabilität der TY82-Zellen signifikant auf rund 5%. Der Anteil von früh-apoptotischen Zellen stieg nach 48 Stunden Koinkubation signifikant auf 45%. Während der Anteil nekrotischer Zellen mit etwa 5% konstant niedrig blieb, stieg der Anteil der spät-apoptotischen Zellen nach 48 Stunden auf 65%,

nach 96 Stunden auf über 70% an. Abbildung 20 zeigt die lichtmikroskopische Dokumentation der Koinkubation von TY82-Zellen mit NK-Zellen über einen Zeitraum von 96 Stunden. Auffällig war, dass bereits nach 2 Stunden Koinkubation markante Veränderungen in der Zellmorphologie der Tumorzellen beobachtet werden konnten.

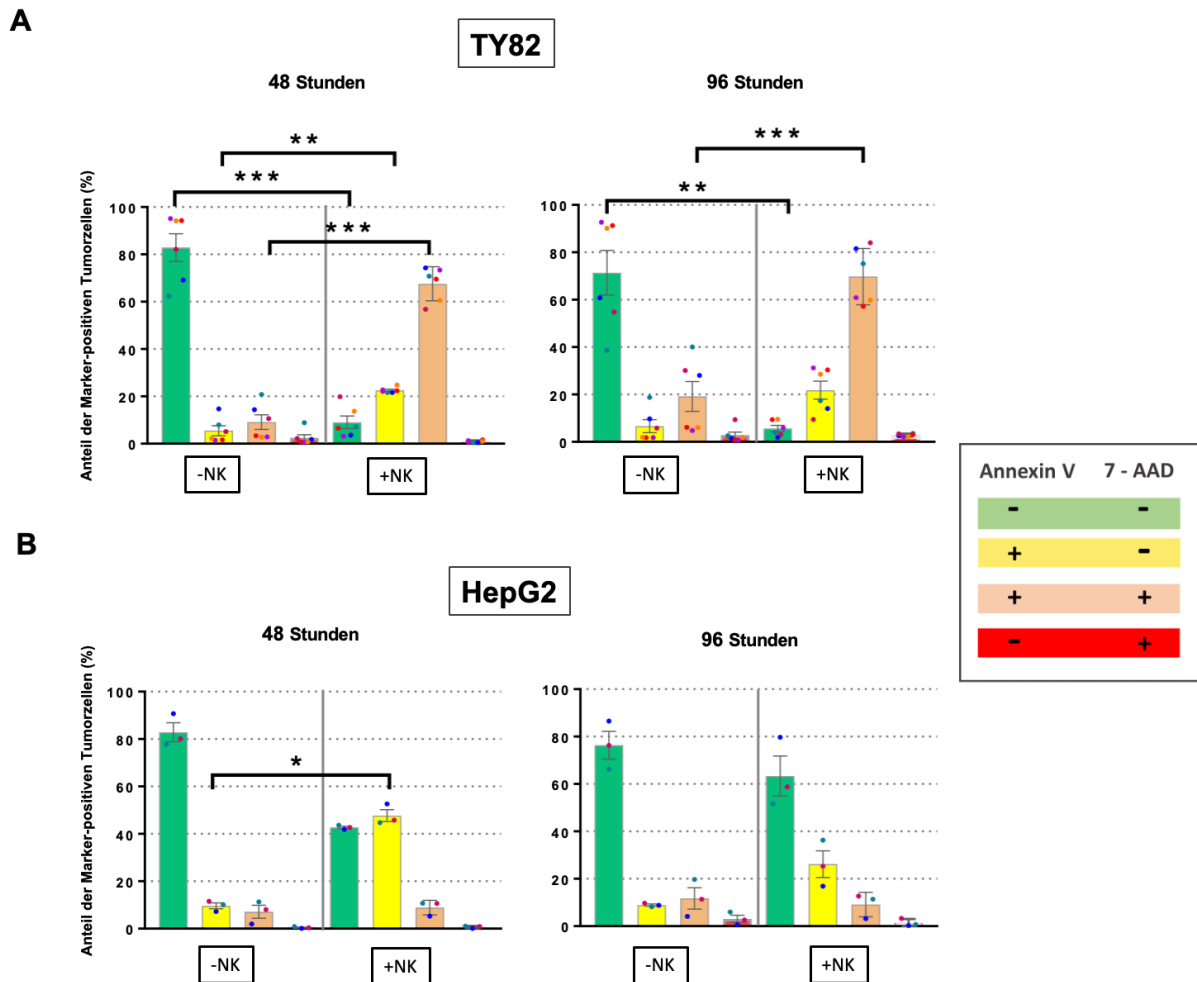


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose nach Koinkubation der Tumor- und NK-Zellen. Vergleich der AnnexinV/7-AAD-Färbung nach 48 und 96 Stunden Koinkubation. Kreise (●), repräsentieren verschiedene biologischen Replikate. Abgebildet sind Tumorzellen ohne NK-Zellen (-NK) und eine Koinkubation mit Tumor- und NK-Zellen gemeinsam (+NK). Die Farben markieren Viabilität (grün), Frühe Apoptose (gelb), Späte Apoptose (beige) und Nekrose (rot). Koinkubations-Ergebnisse der **(A)** TY82- und der **(B)** HepG2-Zellen mit NK-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Die Tumorzellen lösten sich bereits in diesem frühen Stadium vom Boden der Kulturplatte. Sie erschienen deutlich kleiner, runder als zu Beginn des Versuches und waren morphologisch kaum noch von den NK-Zellen zu unterscheiden (siehe Abbildung 21). Dieses veränderte Zellbild blieb auch nach 48 Stunden und 96 Stunden Koinkubation bestehen.

Abbildung 19 B bildet die Analyse der Tumorzelllinie HepG2 hinsichtlich Zellviabilität und Nekrose nach 48 Stunden und 96 Stunden Co-Kultivierung ab. Bei den Tumorzellen allein wiesen die Tumorzellen zu beiden Zeitpunkten eine Viabilität von etwa 80% auf. Der Anteil von früh- und spät-apoptotischen, sowie nekrotischen Zellen lag jeweils bei rund 10%. Nach Koinkubation im Verhältnis 10:1 (NK-Zellen:Tumorzellen) war bereits nach 48 Stunden eine deutliche Reduktion der vitalen Tumorzellen zu beobachten: von ursprünglich ca. 80% auf ca. 45%. Parallel dazu war ein signifikanter Anstieg des Anteils früh-apoptotischer Zellen zu beobachten. Dieser stieg von etwa 10% allein auf nahezu 50% in der Koinkubation. Nach 96 Stunden Kultivierung ohne Koinkubation zeigten die HepG2-Zellen weiterhin eine stabile Vitalität, vergleichbar mit dem 48-Stunden-Zeitpunkt. Es konnte jedoch ein leichter Anstieg der früh-apoptotischen Zellen beobachtet werden, während die Anteile spät-apoptotischer und nekrotischer Zellen weitgehend unverändert blieben.

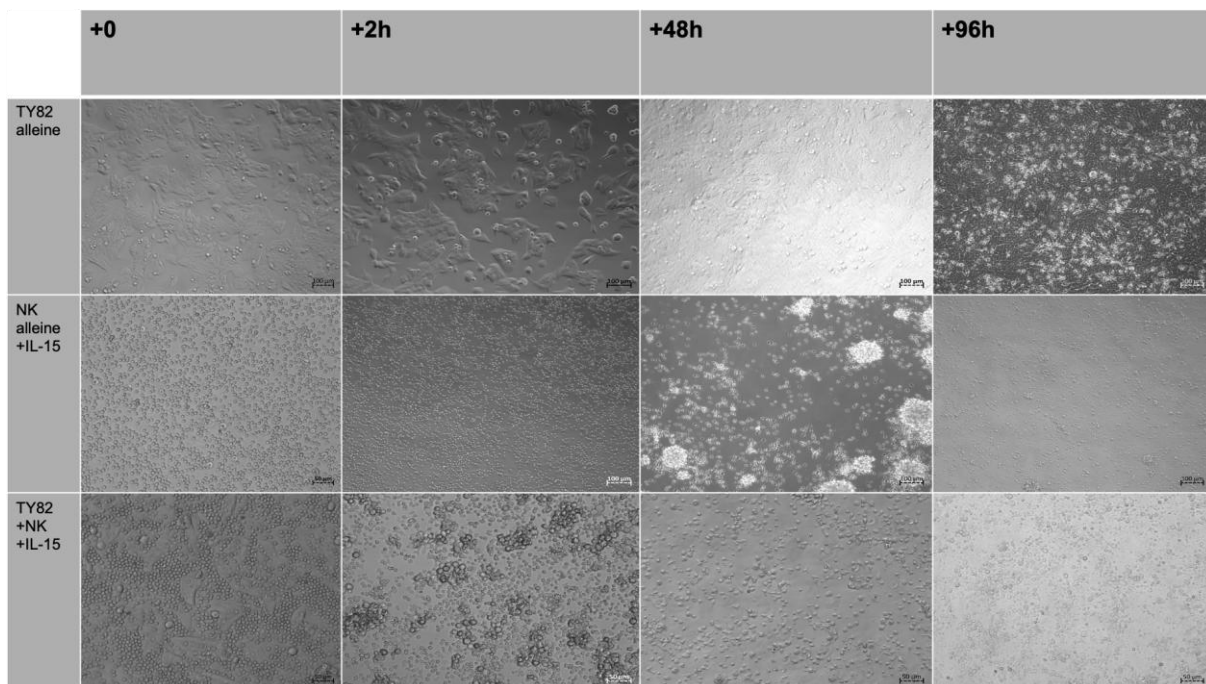


Abbildung 20: Lichtmikroskopische Übersicht über Koinkubation der TY82 und NK-Zellen über 96 Stunden. Dargestellt sind die Tumorzellen allein, NK-Zellen allein, die über Nacht und während der Koinkubation mit IL-15 stimuliert wurden. Des Weiteren ist die Koinkubation beider Zellen dargestellt. Maßstab ist 50-100 μm .

Abbildung 22 dokumentiert die morphologischen Veränderungen der HepG2-Zellen, während der Koinkubation mit NK-Zellen über einen Zeitraum von 96 Stunden. Auch bei dieser Tumorzelllinie ließ sich bereits nach zwei Stunden eine deutliche Veränderung der Zellmorphologie beobachten, vergleichbar mit den Befunden bei den TY82-Zellen: Die Tumorzellen lösten sich vom Boden der Kulturplatte, erschienen verkleinert, rundlicher als zu Beginn und waren morphologisch kaum von den NK-

Zellen zu unterscheiden (siehe Abbildung 21). Dieses Erscheinungsbild blieb sowohl nach 48 Stunden als auch nach 96 Stunden Koinkubation erhalten.

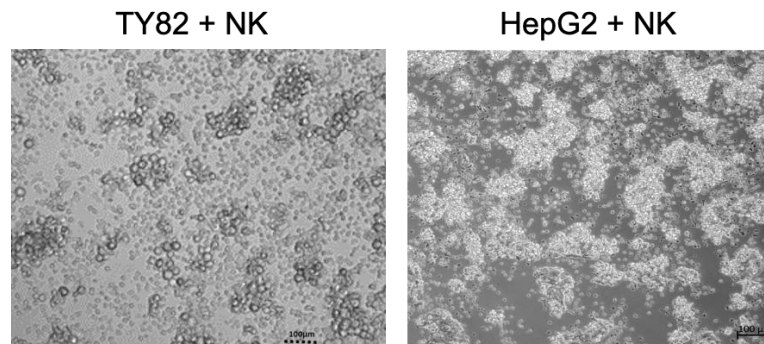


Abbildung 21: Mikroskopische Darstellung der Koinkubation (T+NK) nach 2 Stunden. Zu erkennen ist eine deutliche Morphologie-Änderung der Tumorzellen. Sie wirken kugelter, kleiner und sind von den NK-Zellen kaum zu unterscheiden. Maßstab ist 100 µm.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Koinkubation von Tumor- und NK-Zellen einen deutlichen Einfluss auf die Zellviabilität von Tumorzellen ausübt. Vor allem die apoptotischen Zellanteile steigen signifikant an. Besonders hervorzuheben ist der starke Anstieg spät-apoptotischer Zellen bei der ansonsten als therapie-resistent geltenden Zelllinie TY82.

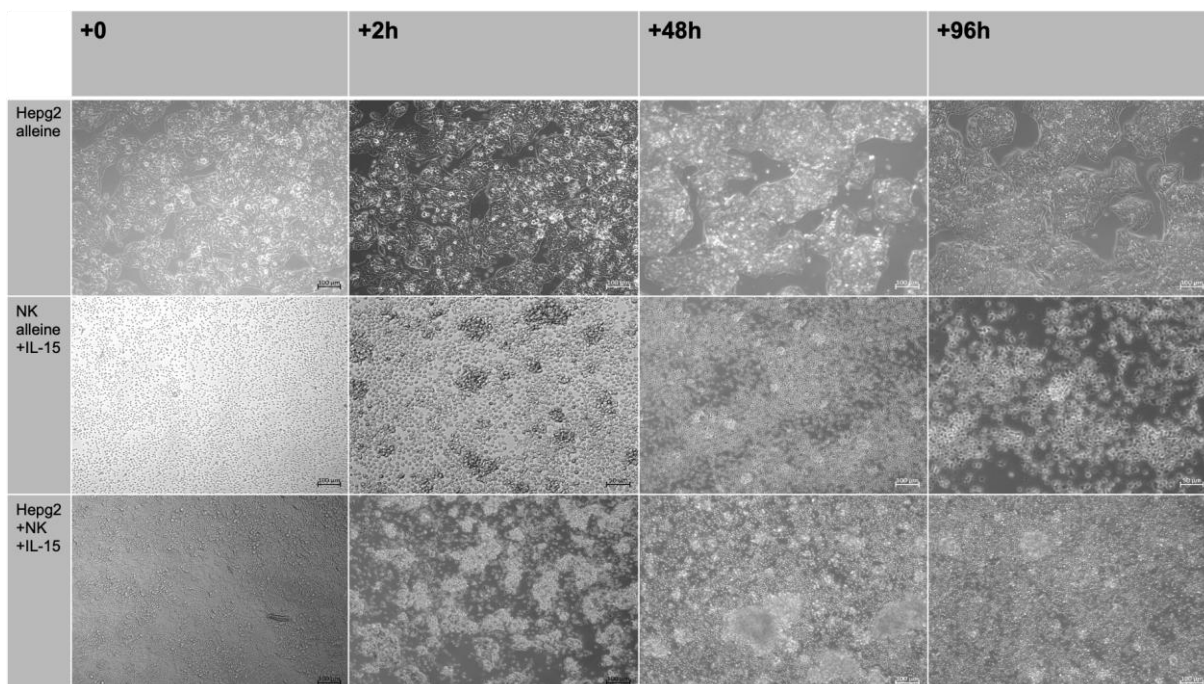


Abbildung 22: Lichtmikroskopische Übersicht über HepG2-Koinkubation mit NK-Zellen über 96 Stunden. Dargestellt sind die Tumorzellen und NK-Zellen allein. An dritter Stelle ist die Koinkubation beider Zellen dargestellt. Maßstab ist 50-100 µm.

4.1.2 Vergleichbare Effekte von Low-Glucose-kultivierten TY82-Zellen und High-Glucose-Tumorzellen nach Koinkubation

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, reagieren Tumorzellen stark auf eine Glukosereduzierung und können nach einer Glukosereduktion empfindlicher auf Chemotherapeutika reagieren. Aus diesem Grund wurden die Tumorzellen in diesem Versuch in einem Medium mit verminderter Glukoserate (1g/L) für mindestens vier Passagen kultiviert mit dem Ziel, ihre Sensitivität gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität im Rahmen der Koinkubationsexperimente zu erhöhen. Die mikroskopische Aufnahme in Abbildung 23 veranschaulicht TY82-Zellen nach Kultivierung in einem Low Glucose-Medium.

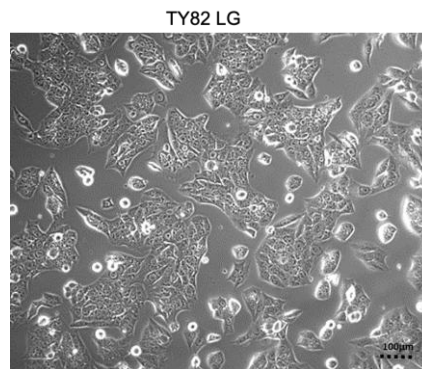


Abbildung 23: TY82 in Low Glucose (1g/L) in Kultur. Die Zellen wurden mindestens vier Passagen in Low Glucose (LG) Medium kultiviert. Die dargestellten Zellen sind Passage 6. Maßstab 100 µm.

Darüber hinaus untersuchten wir, ob bereits nach kürzerer Inkubationszeit erste Hinweise auf apoptotische Prozesse detektierbar waren, da mikroskopische Beobachtungen bereits nach zwei Stunden einen deutlichen Zelluntergang erkennen ließen. Aus diesem Grund wurde die Koinkubation der Tumor- und NK-Zellen über kürzere Zeiträume von 24 Stunden und 48 Stunden durchgeführt. Wie in Abbildung 24 dargestellt, wiesen TY82-Zellen nach 24 Stunden in Kultur eine Zellviabilität von knapp 95% auf, die auch nach 48 Stunden weitgehend konstant blieb. Früh- und spät-apoptotische Zellen, sowie nekrotische Zellen machten zu beiden Zeitpunkten nur knapp unter 5% der Gesamtpopulation aus. Ganz anders verhielt es sich in der Koinkubation mit den NK-Zellen: Nach 24 Stunden fiel die Viabilität auf nahezu 5%, was einer signifikanten Reduzierung von 95% entspricht. Der Anteil von früh-apoptotischer Zellen stieg auf 40%, während die spät-apoptotischen Zellen ebenfalls stark anstiegen und einen Anteil von über 42% erreichten. Nach 48 Stunden waren die Ergebnisse nahezu identisch, wobei der Anteil der früh-apoptotischen Zellen leicht auf einen Wert von etwa 38% sank. Lichtmikroskopisch war ebenfalls nach zwei bis vier Stunden ein deutlicher Zelluntergang zu erkennen (Abbildung 25). Die Tumorzellen erschienen deutlich kleiner und in einer kugel-ähnlichen Form, wodurch sie kaum von den NK-Zellen zu unterscheiden waren. Auch hier liesen sich die Zellen ohne den Einsatz von Trypsin problemlos vom Well-Boden ablösen. Ein lichtmikroskopischer

Vergleich der TY82-Zellen in High-Glukose- und Low-Glukose-Medium nach 2 Stunden Koinkubation ist in Abbildung 26 dargestellt.

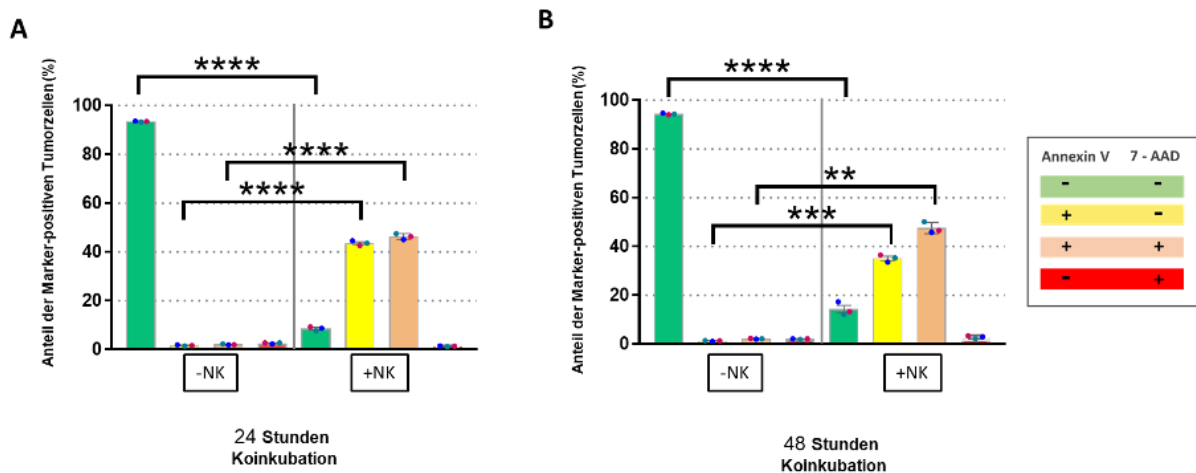


Abbildung 24: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose nach Koinkubation von TY82-Zellen mit NK-Zellen in Low-Glukose-Medium (1g/L). Vergleich der AnnexinV/7-AAD-Färbung nach 48 und 96 Stunden Koinkubation. Kreise (●), repräsentieren verschiedene biologischen Replikate. Abgebildet sind Tumorzellen ohne NK-Zellen (-NK) und eine Koinkubation mit Tumor- und NK-Zellen gemeinsam (+NK). Die Farben markieren Viabilität (grün), Frühe Apoptose (gelb), Späte Apoptose (beige) und Nekrose (rot). Koinkubations-Ergebnisse der TY82-Zellen nach (A) 24 Stunden und (B) 48 Stunden mit NK-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

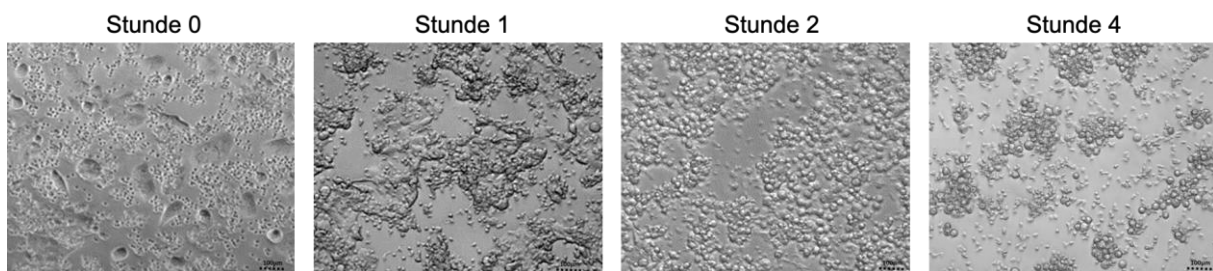


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Übersicht der TY82- und NK-Zellen über einen Zeitraum von vier Stunden. Zu dem Zeitpunkt Stunde 0 und Stunde 1 nach dem Einsäen der NK-Zellen sind die Tumorzellen deutlich erkennbar. Ab Stunde zwei verändern die Tumorzellen ihre Morphologie: Sie verkleinern sich und nehmen in Stunde vier eine kugelige Form an. Maßstab 100 µm.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Koinkubation von Tumor- und NK-Zellen unter Glukose-reduzierten Bedingungen keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kultur in Standardmedium aufwies. Der Glukoseentzug hatte demnach keinen messbaren Einfluss auf das Verhalten oder die Viabilität der Tumorzellen in diesem Versuchsansatz.

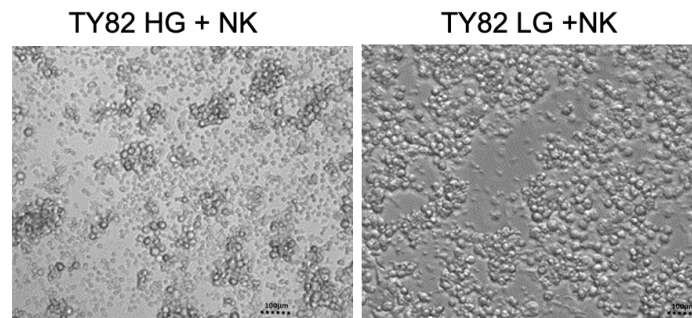


Abbildung 26: Vergleich der Zelllinie TY82 in High-Glucose-Medium (HG) und Low-Glucose-Medium (LG) nach zwei Stunden in Koinkubation mit NK-Zellen. TY82-Zellen zeigen in beiden Medien (HG und LG) bereits ein kugeliges Erscheinungsbild und sind von NK-Zellen schwer zu unterscheiden. Maßstab 100 µm.

4.1.3 Degranulationsanalysen zeigen einen signifikanten Unterschied nach Koinkubation

In diesem Versuch wurde das Degranulationsverhalten von NK-Zellen in Koinkubation mit den Tumorzelllinien TY82 und HepG2 untersucht. Ziel war es, die Reaktion von NK-Zellen auf den Kontakt mit Tumorzellen genauer zu untersuchen. Bei der Auswertung dieses Versuchs wurde ausschließlich das NK-Gate (CD45⁺) berücksichtigt. Die NK-Zellen wurden sowohl allein als auch in Koinkubation mit einer Tumorzelllinie nach 4, 16 und 24 Stunden gemessen. Abbildung 27 zeigt die zusammenfassenden Ergebnisse, die den Vergleich der CD107a Expression bei unterschiedlichen Zielzellen, drei unterschiedlichen Inkubationszeiten und in 3-facher Ausführung (biologische Triplikate) darstellen. Nach der Inkubation der NK-Zellen mit der Tumorzelllinie TY82 zeigte sich ein signifikanter Anstieg der durchflusszytometrisch gemessenen CD107a-Expression nach vier Stunden im Vergleich zu den NK-Zellen, die ohne Tumorzellen inkubiert wurden. Dieser Anstieg war nach 16 und 24 Stunden nicht detektierbar (Abbildung 27). Das Maß für die Aktivierung der zytotoxischen Lyse, die anhand der Degranulation der NK-Zellen beurteilt wird, wies bei der Zelllinie HepG2 keine statistisch signifikanten Unterschiede auf. Allerdings war eine Tendenz zum Anstieg der Degranulation bei NK-Zellen in Ko-Kultur mit HepG2-Zellen zu allen drei Zeitpunkten detektierbar. Die Degranulationswerte lagen durchgehend im Bereich von 10-30%.

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass die Degranulationsaktivität der NK-Zellen gegenüber der Tumorzelllinie TY82 besonders rasch einsetzt. Bereits nach vierstündiger Koinkubation ließ sich eine signifikante Zunahme der CD107a-Oberflächenexpression nachweisen, was auf eine frühe Aktivierung hinweist. Im Vergleich dazu induzierte die HepG2-Zelllinie eine geringere Degranulationsantwort, allerdings über alle drei Zeitpunkte hinweg.

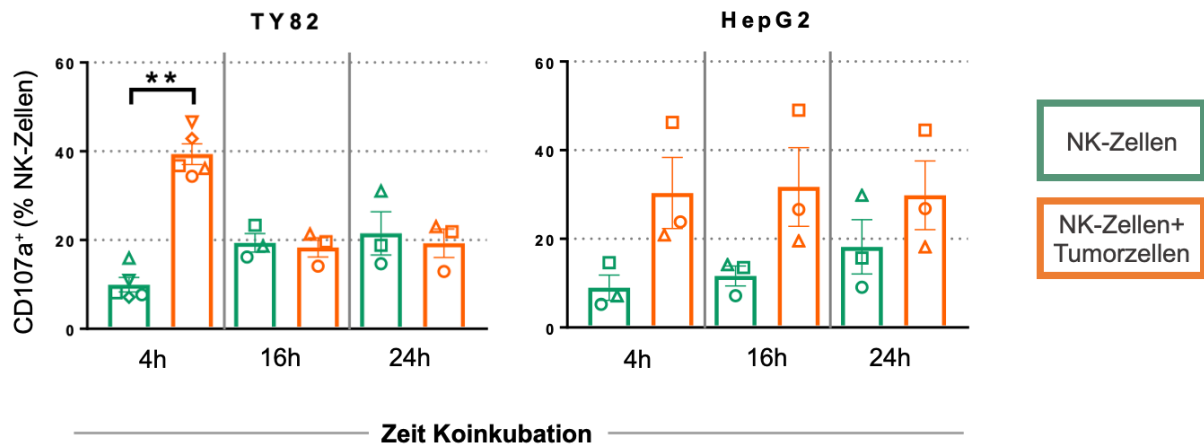


Abbildung 27: Durchflusszytometrische Analyse der Degranulation der NK-Zellen. Vergleich der CD107a-Expression bei unterschiedlichen Target-Zellen nach 4, 16 und 24 Stunden. Kreise (°) stehen hier für die NK-Zellen in alleiniger Kultur, Vierecke (□) bedeuten eine Koinkubation von NK-Zellen mit Tumorzellen gemeinsam. Die unterschiedlichen drei Formen markieren die unterschiedlichen biologischen Replikate. **Links** zeigt die Degranulation von NK-Zellen in Koinkubation mit der Tumorzelllinie TY82 und mit der Kontrolle der NK-Zellen allein. **Rechts** zeigt die Ergebnisse der Koinkubation mit der Tumorzelllinie HepG2. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt $**p < 0,01$.

4.1.4 GLUT-1 Expression steigt während der Koinkubation von NK-Zellen und der Tumorzelllinie TY82 signifikant an

In diesem Experiment wurde die glykolytische Aktivität der NK-Zellen durch die Detektion des GLUT-1-Markers mittels spezifischer Anfärbung untersucht. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der GLUT-1-Expression bei NK-Zellen, sowohl allein als auch in Koinkubation mit Tumorzellen (siehe Abbildung 28), zeigten TY82-Zellen nach 16 Stunden einen signifikanten Unterschied bei drei durchgeführten biologischen Replikaten, während dies bei 4 Stunden nicht der Fall war. Wie in Abbildung 28 A dargestellt ist, stieg die Anzahl der GLUT-1⁺ NK-Zellen in Koinkubation mit TY82-Zellen nach 16 Stunden von 45% auf nahezu 90%. Im Vergleich dazu wiesen die HepG2-Zellen (siehe Abbildung 28 B) keinen Unterschied in der Expression von GLUT-1 bei NK-Zellen mit und ohne Koinkubation mit Tumorzellen auf. Die GLUT-1-Expression blieb auf einem gleichbleibend konstanten Niveau.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass NK-Zellen eine um 40% höhere GLUT-1-Expression aufwiesen, sobald sie 16 Stunden in Koinkubation mit der Zelllinie TY82 verbracht haben, im Vergleich zu einer alleinigen Inkubation über denselben Zeitraum. Bei der Tumorzelllinie HepG2 hingegen handelt es sich um einen glukose-unabhängigen Prozess.

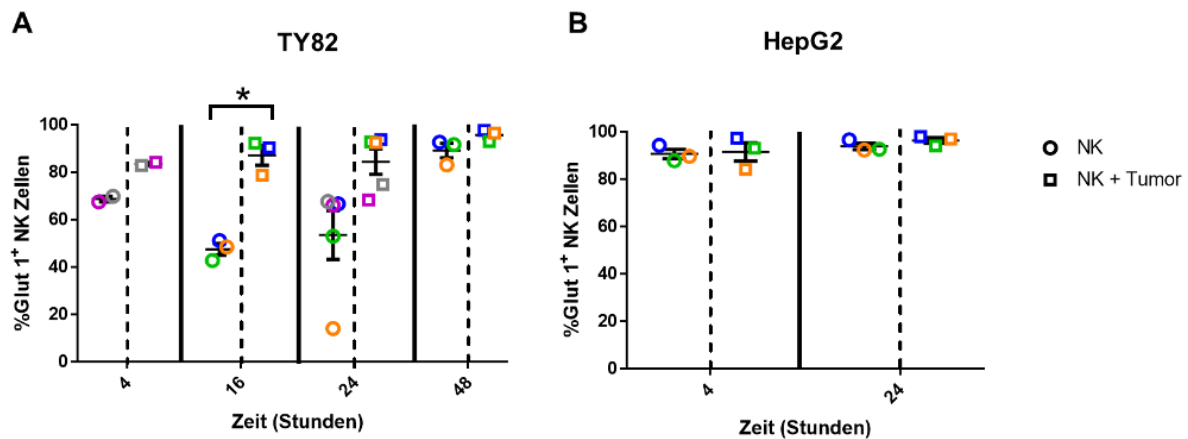


Abbildung 28: Durchflusszytometrische Analyse der Expression von GLUT-1. Dargestellt sind prozentuale Anteile der GLUT-1⁺ NK-Zellen einmal allein (○) und in Co-Kultur mit zwei verschiedenen Tumorzelllinien (□) nach 4 Stunden und 24 Stunden und in farblich markierten biologischen Replikaten. Anteile von GLUT-1⁺ von NK-Zellen allein und in Koinkubation mit der Tumorzelllinie **(A)** TY82 und **(B)** HepG2. Die statistische Auswertung erfolgte mittels paired t-Test, dabei gilt * $p < 0,05$.

4.1.5 Analyse der Zytotoxizität von NK-Zellen nach Behandlung mit Chemotherapeutika und anschließender Koinkubation

In den folgenden Abschnitten wurden die Zellen vor der Koinkubation mit verschiedenen Chemotherapeutika vorbehandelt. Der genauere Ablauf ist Kapitel 3.2.15 zu entnehmen. Ziel war es, die Zytotoxizität der NK-Zellen in Koinkubation weiter zu verbessern und einen synergistischen Effekt von Chemotherapeutikum und NK-Zellen zu erreichen.

4.1.5.1 Konzentrationsabhängige Wirkungsprüfung der verwendeten Chemotherapeutika

In einem ersten Schritt wurden die verschiedenen Chemotherapeutika hinsichtlich ihrer Konzentration und Wirkung auf die Tumorzellen untersucht. Wie in 3.2.21 beschrieben, wurden die Ziellinien HepG2 und TY82 mit unterschiedlichen Konzentrationen der Chemotherapeutika Etoposid und Cisplatin behandelt und nach 24, 48 und 96 Stunden mit dem CellTiterBlue Assay gemessen. Die Proliferation lebender Zellen wurde im Vergleich zu den mit Kontrollmedium behandelten Zellen beurteilt, um zu untersuchen, ob die Chemotherapeutika einen wachstumshemmenden Effekt auf die ausgewählten Tumorzellen haben. Wie in Abbildung 29 A und B dargestellt, zeigte sich bei der Kontrollkonzentration bei beiden Zelllinien eine gleichbleibende Vitalität über einen Zeitraum von vier Tagen. Betrachtet man die Ziellinie HepG2 unter Etoposid (Abbildung 29 A), ist zu erkennen, dass die Viabilität unter einer Behandlung mit 10 nM bis 1 μ M auf einem konstanten Niveau blieb, jedoch deutlich geringer war als bei der Behandlung mit dem Kontrollmedium. Ab einer Konzentration von 5 μ M kam es zu

einem deutlichen Vitalitätsverlust. Im Vergleich zu den Ergebnissen von Etoposid, konnte bei einer Cisplatin-Konzentration von 10 nM bis 1 μ M eine nahezu identische Viabilität wie die Kontrollkonzentration beobachtet werden. Eine Konzentration von 20 μ M führte ab 96 Stunden zu einer Reduzierung der Viabilität auf nahezu 0, was einer Reduzierung von über 90% entspricht und als deutliche Wachstumsinhibition beurteilt werden kann. Wie in Abbildung 29 B dargestellt, reagierte die Zelllinie TY82 deutlich weniger empfindlich auf Etoposid als die Tumorzelllinie HepG2. Über einen Zeitraum von 96 Stunden wiesen die Etoposid-Konzentrationen von 10 nM bis 500 nM ein vergleichbares Niveau zur unbehandelten Kontrollgruppe auf. Ab einer Konzentration von 1 μ M und nach 96 Stunden verzeichnete auch TY82 einen deutlichen Vitalitätsverlust von ca. 35%. Cisplatin hatte einen vergleichbaren Effekt auf die Tumorzelllinie TY82. Die Cisplatin-Konzentrationen von 10 nM bis 1 μ M führten über 96 Stunden zu einem vergleichbaren Niveau wie die Kontrollmedien. Ab einer Konzentration von 5 μ M und nach 96 Stunden verzeichnete auch TY82-Zellen eine deutliche Vitalitätsverringering von ca. 20%. Die höchste verwendete Konzentration von 20 μ M führte bereits nach 48 Stunden zu einer Verringerung der viablen Zellen um 35%.

Zur weiteren Absicherung der Wirksamkeit sowie zur Bestimmung der optimalen Behandlungskonzentration von Etoposid und Cisplatin erfolgte der Einsatz einer zusätzlichen Positivkontrolle. Hierbei wurden drei verschiedene Tumorzelllinien, TY82, HepG2 und A549, über 24 und 48 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Stoffes behandelt und danach gezählt. Nähere Informationen zum Ablauf sind in Abschnitt 3.2.19 zu finden. Wie in Abbildung 30 dargestellt, konnte bei allen drei Zelllinien bei der Kontrollkonzentration ein gleichmäßiges und schnelles Wachstum über den Zeitraum von vier Tagen festgestellt werden. TY82 zeigte keine Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum (Abbildung 30 A). Die höchste getestete Konzentration führte zu keiner Verringerung der Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen oder der DMSO-Kontrolle. Das beobachtete Wachstumsmuster entsprach weitgehend dem der mit Kontrollmedien behandelten Zellen, was auf eine fehlende Wirksamkeit des Chemotherapeutikums gegenüber diesen Tumorzellen hindeutet. Bei den HepG2-Zellen (Abbildung 30 B) führte eine Konzentration von 100 nM und höher zu einer deutlichen Verringerung der Zellzahl im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle und Behandlung mit 50 nM. In Abbildung 30 (C) weist die Zelllinie A549 die höchste Sensitivität gegenüber Etoposid auf. Während die unbehandelte Kontrolle und die 50 nM-Konzentration nach 48 Stunden einer Zellzahl von nahezu 35.000 aufwies, reduzierte sich die Zellzahl bei Etoposidkonzentrationen von 100 nM und 250 nM auf lediglich 15.000 Zellen pro Well. Es war eine deutliche Wachstumsinhibition der Zellen zu verzeichnen.

Die Ergebnisse bestätigten die Wahl der Konzentration von 100 nM Etoposid für die weiteren Experimente und zeigten eine erhöhte Sensitivität der HepG2- und A549-Zellen gegenüber höheren Dosen (100 nM und 250 nM) von Etoposid. Für Cisplatin wurde ebenfalls eine Konzentration von 100 nM ausgewählt.

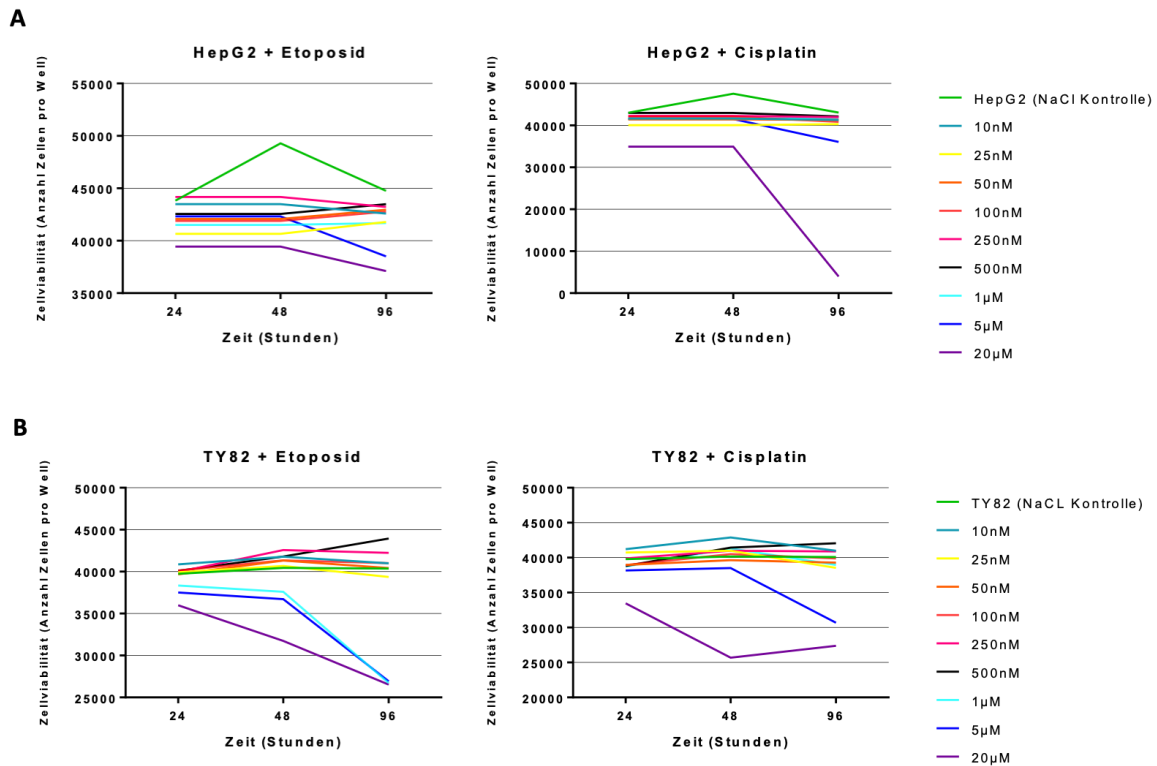


Abbildung 29: Untersuchung der Proliferationsrate unter Chemotherapie in verschiedenen Zelllinien. Die Tumorzellen HepG2 und TY82 wurden mit einer Dichte von 40.000 Zellen pro Well in eine 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und 24 Stunden später mit den Chemotherapeutika Etoposid oder Cisplatin in verschiedenen Konzentrationen (verschiedene Farben der Linien) behandelt. Nach 24, 48 und 96 Stunden wurde die Zellviabilität mittels CellTiterBlue Assay gemessen. Vergleich der Wachstumskurven der Tumorzelllinie TY82 (**A**) und HepG2 (**B**) über 96 Stunden.

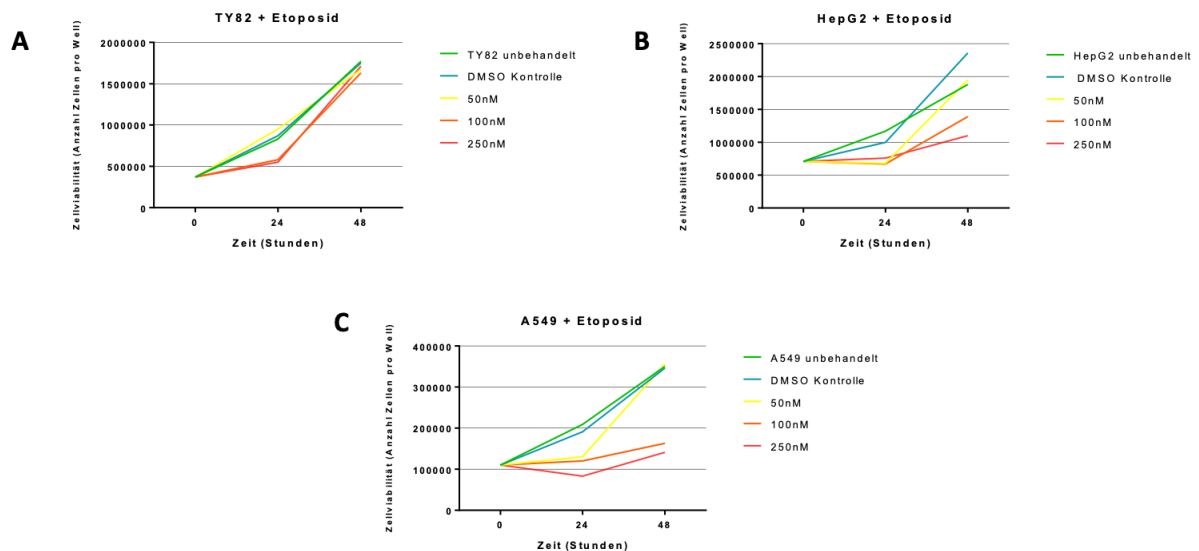


Abbildung 30: Positivkontrolle verschiedener Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum Etoposid. (**A**) Wachstumskurven der Tumorzelllinie TY82 über 24 und 48 Stunden in verschiedenen Konzentrationen von Etoposid. Mittlere Anzahl der Zellen von HepG2 (**B**) und A549 (**C**) pro Well während der Behandlung.

4.1.5.2 Chemotherapeutikum führt trotz Anstieg der NK-Zell vermittelten Zytotoxizität und einer Caspase 3/7-Aktivität zu keinem synergistischen Effekt

Da in den vorherigen Versuchen die Zytotoxizität mit Hilfe einer 7-AAD/AnnexinV-Färbung bestimmt wurde, entschieden wir uns, apoptotischen Prozessen noch gezielter nachzugehen. Zu diesem Zweck wählten wir eine spezifisch auf Apoptose ausgerichtete Methode, den ApoTox-Glo™ Triplex Assay von Promega aus (siehe Kapitel 3.2.20). Eine Besonderheit dieses Versuches war die Verwendung der nicht-adhärenenten Tumorzelllinie K-562. Alle Versuche wurden in drei biologischen und technischen Replikaten durchgeführt. Wie in 3.2.20 beschrieben, erlaubt der Assay die simultane Messung von Viabilität, Zytotoxizität, und Caspasen 3/7-Aktivität. In Vorversuchen kamen wir allerdings zu der Erkenntnis, dass eine spezifische Bestimmung der Viabilität der Tumorzellen aufgrund der in Koinkubation vorhandenen lebenden NK-Zellen nicht zuverlässig war. Deshalb verwendeten wir nur die Caspase- und Zytotoxizitätsmessung. Die Detektion der Caspase 3/7-Aktivität (siehe Abbildung 31 A) nach vier Stunden Koinkubation von TY82-Zellen und NK-Zellen ergab einen starken und signifikanten Anstieg der RLU-Werte von unter 5000 auf über 800.000. Ein vergleichbarer, wenn auch geringerer Anstieg konnte bei den K-562-Zellen beobachtet werden. Auch hier führte eine vierstündige Koinkubation zu einer signifikanten Erhöhung der Caspaseaktivität. Das Ergebnis einer Vorbehandlung der TY82-Zellen mit Etoposid und anschließender Koinkubation war ebenfalls ein hoher und signifikanter Anstieg apoptotischer Aktivität, in einem Ausmaß, das mit der unbehandelten Koinkubation vergleichbar war. Bei der Zytotoxizität (siehe Abbildung 31 B) führte die Vorbehandlung mit Etoposid im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu keinem signifikanten Anstieg. Dagegen zeigte die vierstündige Koinkubation einen signifikanten Anstieg der RFU-Werte von ca. 10.000 auf über 30.000. Eine zusätzliche Vorbehandlung mit Etoposid führte zu einem ähnlichen, aber nicht signifikant höheren Zytotoxizitätseffekt im Vergleich zur alleinigen NK-Zell-Koinkubation. Bei den K-562-Zellen konnte bei der vierstündigen Koinkubation mit NK-Zellen ebenfalls ein deutlicher Anstieg der Zytotoxizität erkannt werden. Allerdings erreichte dieser Anstieg nur in einzelnen Vergleichsgruppen (NK-Zellen und Koinkubation) Signifikanz gemäß des Tukey's multiple comparisons test mit Greenhouse-Geisser Korrektur.

Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Vorbehandlungsdauer mit den Chemotherapeutika Cisplatin und Etoposid zu einem synergistischen Erfolg führt, wurde der zuvor beschriebene Versuch erneut durchgeführt. Dabei erfolgte eine verlängerte Chemotherapie-Vorbehandlung über 48 Stunden von Etoposid oder Cisplatin, gefolgt von einer 24-stündigen NK-Zell-Koinkubation. Zusätzlich wurde auch die Tumorzelllinie HepG2 einbezogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Die Detektion der Caspase 3/7-Aktivität nach 24 Stunden der TY82 allein (siehe Abbildung 32 A) zeigte vergleichbare Werte wie in der vorherigen Analyse (vgl. Abbildung 31), eine 48-stündige Etoposidbehandlung resultierte jedoch in einem signifikanten Anstieg der Apoptose-Aktivität auf 500.000 RLU. Bei Cisplatin konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden, die Aktivität blieb auf dem Niveau

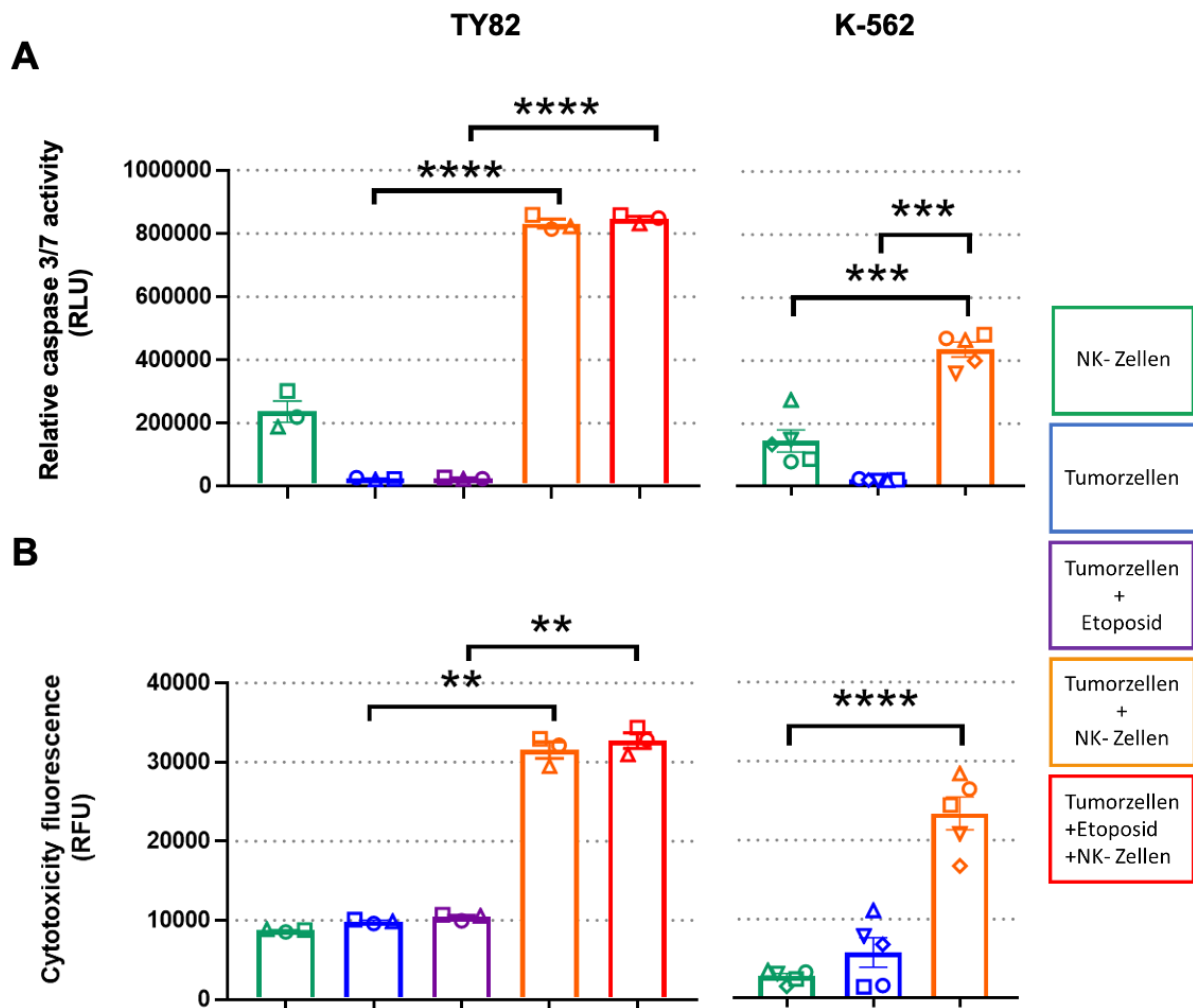


Abbildung 31: Analyse der Zytotoxizität und Caspase 3/7-Aktivität mithilfe des ApoTox-Glo™ Triplex Assays nach vierstündiger Koinkubation in 96-Well-Platten. Kreise (●), Vierecke (■) und Dreiecke (▲) repräsentieren unabhängige biologische Replikate. **(A)** Darstellung der Caspase 3/7-Aktivität zwischen verschiedenen Tumorzellen (TY82 und K-562) und NK-Zellen in einer Koinkubation. **(B)** Grafische Darstellung der Zytotoxizität unter den gleichen Bedingungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test mit Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

unbehandelter TY82-Zellen. In den HepG2-Zellen allein ließ sich weder für Etoposid noch durch Cisplatin eine Erhöhung der Caspase-Aktivität nachweisen, die gemessenen Werte entsprachen denen der unbehandelten Kontrollgruppe. Die zusätzliche Koinkubation mit NK-Zellen führte bei TY82-Zellen zu einem signifikanten Anstieg der Caspase3/7-Aktivität auf etwa 100.000 RLU. Interessanterweise bewirkte die Koinkubation mit Vorbehandlung bei TY82-Zellen eine geringere Caspase-Aktivität im Vergleich zur unbehandelten Koinkubation mit NK-Zellen. Dennoch war der Wert signifikant höher als bei den Tumorzellen, die ausschließlich mit Etoposid behandelt wurden. Bei Cisplatin führte es zu einer vergleichbaren signifikanten Caspase-Aktivität, wie bei den Tumorzellen, die nur mit NK-Zellen inkubiert wurden. Bei den Tumorzellen HepG2 ergab sich ein ähnliches Bild: Die Kombination aus Cisplatin und NK-Zellen

fürte zu einer signifikanten, jedoch nicht gesteigerten Caspase 3/7-Aktivität im Vergleich zur Koinkubation ohne Vorbehandlung. Wurden die Zellen mit Etoposid vorbehandelt und danach koinkubiert, kamen sie auf ca. 65.000 RLU, was zu einem signifikanten Anstieg führte.

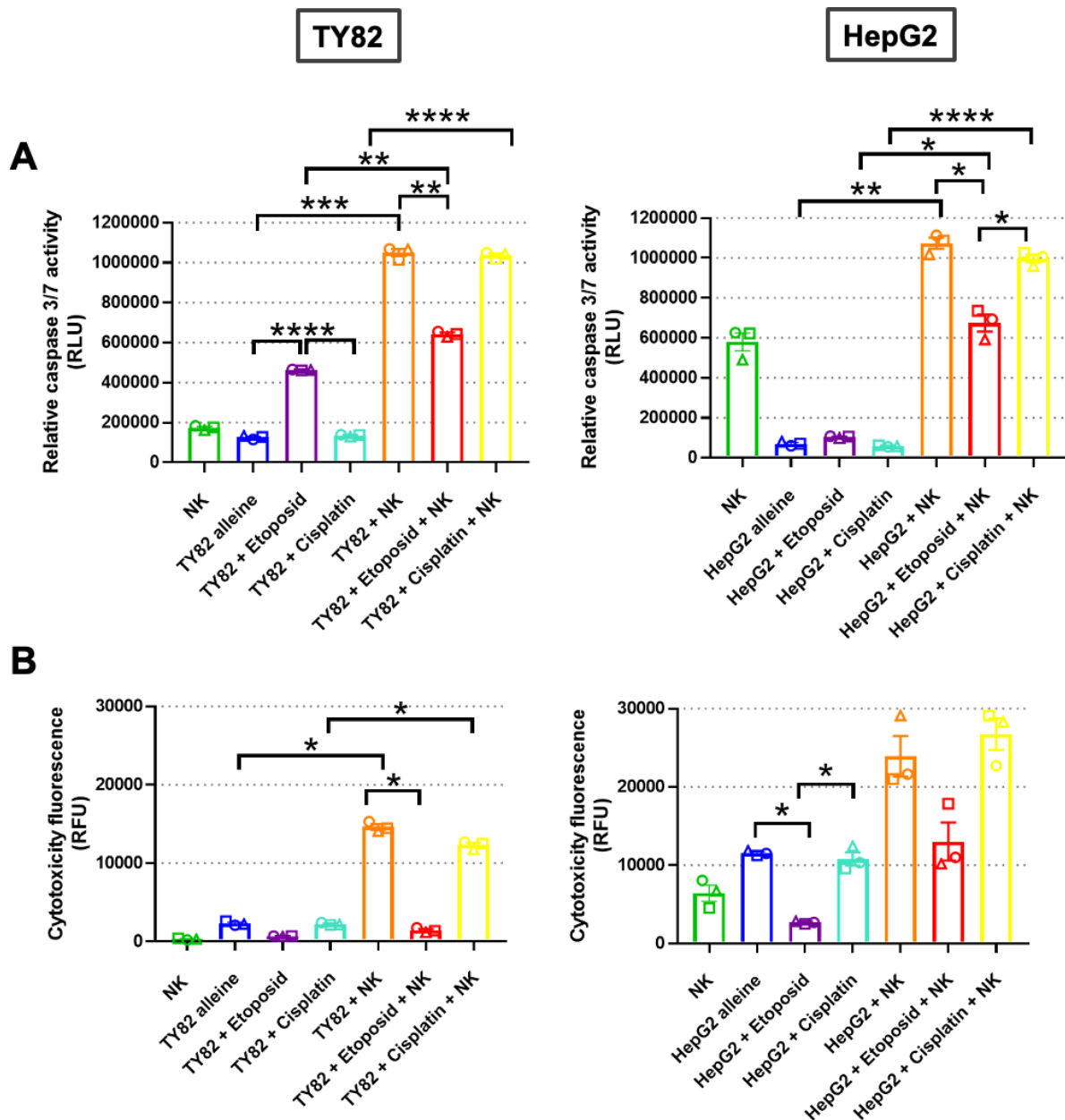


Abbildung 32: Zytotoxizität und Caspase 3/7-Aktivität nach verlängerter Chemotherapie-Behandlung, analysiert mittels ApoTox-Glo™ Triplex Assay. Vergleich verschiedener Targetzellen nach 48-stündiger Chemotherapiebehandlung und 24 Stunden Koinkubation in 96-Well-Platten. Kreise (●), Vierecke (■) und Dreiecke (▲) markieren die unterschiedlichen biologischen Replikate. Koinkubations-Ergebnisse der TY82- und HepG2-Zellen nach einer 48-stündigen Chemotherapiebehandlung und einer 24-stündigen Koinkubation mit NK-Zellen (NK) (**A**) zeigt die Caspase 3/7-Aktivität und (**B**) die Zytotoxizität. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Bei der Zytotoxizität (siehe Abbildung 32 B) wurden die Tumorzellen TY82 und HepG2, sowie die NK-Zellen allein gemessen, der restliche Verlauf lief ebenfalls identisch zum vorherigen Versuch bei der Messung der Caspase 3/7 ab. Die Chemotherapie-Behandlung führte bei TY82-Zellen allein zu keinem Anstieg der Zytotoxizität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, weder für Etoposid noch für Cisplatin. Bei der Zytotoxizität ergaben sich ähnliche Ergebnisse: Waren die Tumorzellen vor der Koinkubation 48 Stunden mit Etoposid vorbehandelt, führte das in Kombination mit NK-Zellen zu einer signifikant reduzierten Zytotoxizität, die vergleichbar mit der unbehandelten Kontrollgruppe war. NK-Zellen allein zeigten keine Zytotoxizität. Eine Vorbehandlung mit Cisplatin bewirkte ebenfalls keinen Anstieg der Zytotoxizität bei den Tumorzellen allein. In der Koinkubation konnte allerdings eine signifikante Erhöhung festgestellt werden, wenngleich diese leicht unter dem Niveau der Koinkubation ohne Vorbehandlung lag. Bei den HepG2 Zellen führte eine 48-stündige Etoposid-Behandlung zu einer signifikanten Reduzierung der Zytotoxizität, allein und in Koinkubation. Cisplatin zeigte vergleichbare Zytotoxizitätswerte wie die unbehandelte Kontrolle. Auch hier führte die Koinkubation zu einem Anstieg der Zytotoxizität, allerdings ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle.

Abbildung 33 enthält mikroskopische Aufnahmen der Zelllinie TY82 nach vierstündiger Koinkubation mit und ohne Vorbehandlung mit Etoposid. Morphologisch ließ sich kein deutlicher Unterschied zwischen den behandelten und unbehandelten Zellen feststellen. In beiden Fällen zeigte sich jedoch bereits nach 4 Stunden eine deutliche Veränderung der Tumorzellen in der Koinkubation: Die Zellen erschienen kleiner und runder, lösten sich ohne enzymatische Behandlung (Trypsin) vom Plattenboden und Anzeichen einer Schädigung wurden deutlich erkennbar.

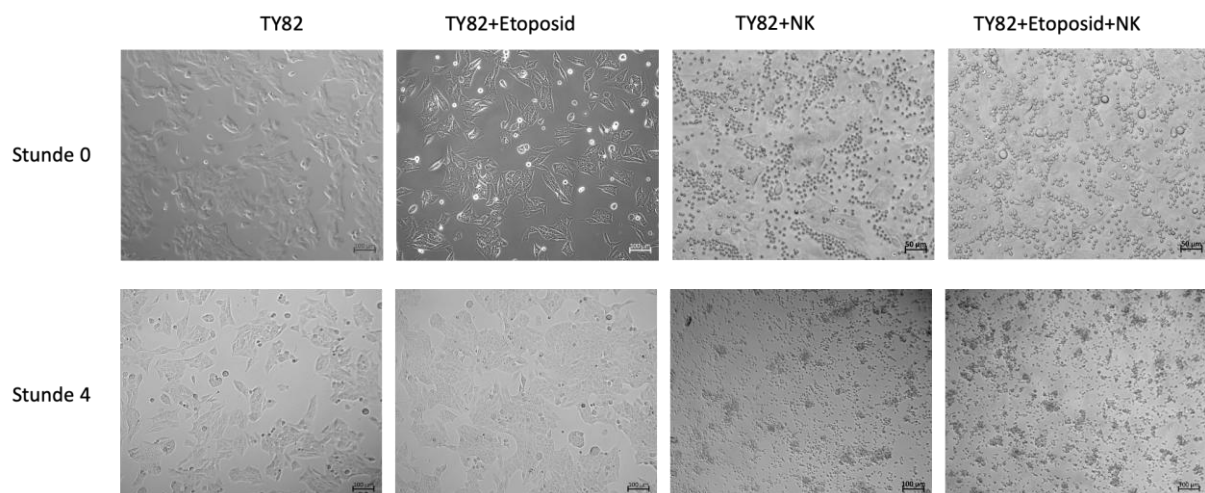


Abbildung 33: Vergleich der Tumorzelllinie TY82 mit und ohne Vorbehandlung von Etoposid nach vier Stunden Koinkubation. Maßstab 50-100 µm.

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse, dass NK-Zellen gegenüber TY82-Zellen eine höhere Zytotoxizität ausüben als gegenüber K-562-Zellen. Zudem induzieren NK-Zellen in TY82-Zellen effizient die Aktivierung von Caspase 3/7, allerdings ohne Effekt durch zusätzliches Etoposid. Auch eine Verlängerung der chemotherapeutischen Vorbehandlung mit Etoposid oder Cisplatin über 48 Stunden führte nicht zu einem solchen synergistischen Anstieg der NK-Zell-vermittelten Effekte. Im Gegenteil: Eine Vorbehandlung mit Etoposid resultierte in beiden Tumorzelllinien in einer signifikanten Reduzierung der Zytotoxizität, im Vergleich zu den unbehandelten Proben.

4.1.6 Der PARP-Inhibitor Olaparib und seine Wirkung auf die Zytotoxizität in der Koinkubation mit NK-Zellen

In den bisherigen Versuchen wurde primär die Apoptose als Ursache für den beobachteten Zelluntergang untersucht. Zwar zeigten die Daten eine erhöhte apoptotische Aktivität, jedoch wiesen die Zellen bereits nach nur zwei Stunden unter dem Mikroskop deutlich morphologische Veränderungen und Anzeichen starker Zellschädigung auf. Diese Beobachtungen ließen den Verdacht aufkommen, dass neben Apoptose und Nekrose möglicherweise ein weiterer Zelltodmechanismus beteiligt ist. Aus diesem Grund entschieden wir uns, den Zelltodweg des Parthanatos näher zu untersuchen. Zur weiteren Charakterisierung dieses Mechanismus sollte der PARP-Inhibitor Olaparib eingesetzt und dessen Einfluss sowohl bei Monotherapie als auch in Koinkubationsexperimenten analysiert werden.

4.1.6.1 Wachstumsverhalten der Tumorzelllinien unter Olaparib-Behandlung und Autofluoreszenz-Testung

Im Rahmen der Behandlung der Tumorzelllinien TY82 und HepG2 wurde zunächst deren Proliferationsraten unter Einfluss des PARP-Inhibitors Olaparib untersucht. Hierzu wurden die Tumorzellen in 96-Well Zellkulturplatten ausgesät und nach einer 24-stündigen Adhäsionsphase mit verschiedenen Konzentrationen von Olaparib (1 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M, 10 μ M) behandelt. Die Zellviabilität wurde zu vier Zeitpunkten (24, 48, 72 und 96 Stunden) mittels des CellTiter-Blue® Assays bestimmt (vgl. Kapitel 3.2.21).

Die Ergebnisse, dargestellt in Abbildung 34 A, zeigen eine deutlich höhere Sensitivität der TY82-Zellen gegenüber Olaparib im Vergleich zu den HepG2-Zellen. Während bei den TY82-Zellen eine Konzentration von 1 μ M Olaparib zu keiner signifikanten Wirkung auf die Zellviabilität führte, war ab einer Konzentration von 2,5 μ M und insbesondere nach 48 Stunden ein deutlicher Rückgang der Viabilität im Vergleich zu den unbehandelten Tumorzellen zu beobachten. Die stärksten Effekte auf die Viabilität

waren bei Konzentrationen 5 μM und 10 μM nach 72 Stunden zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten die HepG2-Zellen (Abbildung 34 B) über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg ein weitgehend konstanten Viabilitätsverlauf, unabhängig von den eingesetzten Olaparib-Konzentrationen. Es waren keine signifikanten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle festzustellen, was auf eine deutlich geringere Sensitivität dieser Tumorzellen auf Olaparib hinweist.

Auf Basis dieser Ergebnisse wurde für alle weiterführenden Experimente eine Olaparib-Konzentration von 5 μM gewählt, da diese in der sensitiven Zelllinie TY82 einen ausgeprägten Effekt auf die Zellviabilität führte, während sie gleichzeitig für vergleichende Analysen mit weniger sensitiven Ziellinien geeignet blieb.

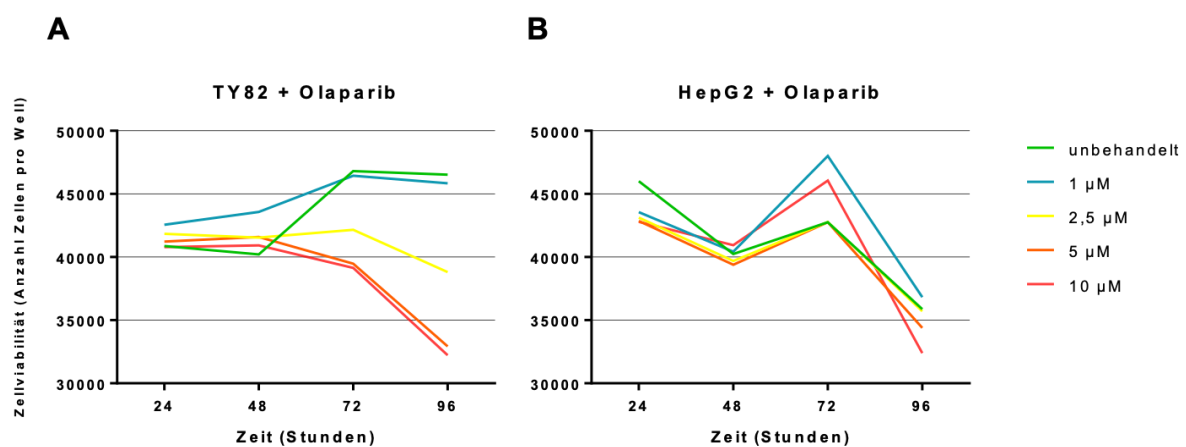


Abbildung 34: Analyse der Proliferationsrate unter Olaparib-Behandlung in den Tumorzelllinien TY82 und HepG2. Die Tumorzellen wurden mit einer Dichte von 40.000 Zellen pro Well in eine 96-Well Zellkulturplatte ausgesät und 24 Stunden später mit Olaparib in unterschiedlichen Konzentrationen (1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM) behandelt. Nach 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® Assay gemessen. Zellviabilitätsmessung der Tumorzellen **(A)** TY82 und **(B)** HepG2 unter Olaparib-Behandlung über einen Zeitraum von 96 Stunden.

Während der Durchführung einer simultanen, mehrfarbigen Fluoreszenzanalyse mittels des Durchflusssytometers kann es zu Problemen von Autofluoreszenzen von Substanzen kommen. Aus diesem Grund wurde zunächst im Labor geprüft, ob Olaparib autofluoreszente Eigenschaften aufweist und möglicherweise in für spätere Versuche relevante Fluoreszenzkanäle emittiert. Hierzu wurden HepG2-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät und nach 24 Stunden mit Olaparib in verschiedenen Konzentrationen (1 μM , 2,5 μM , 5 μM , 10 μM) behandelt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und analysiert. Wie in im Anhang Abbildung 48 dargestellt, konnte in keinem der zehn untersuchten Fluoreszenzkanäle eine relevante Autofluoreszenz festgestellt werden. Nach erfolgreicher Ausschlusskontrolle der autofluoreszenten Eigenschaften konnte mit den ersten Experimenten mit dem PARP-Inhibitor Olaparib begonnen werden.

4.1.6.2 NK-Zell-Zytotoxizität nach Koinkubation mit Tumorzellen: Deutliche Effekte ohne synergistische Wirkung von Olaparib

Zur genaueren Analyse des zytotoxischen Effekts von Olaparib wurde ein experimenteller Ansatz entsprechend Kapitel 4.1.1 gewählt, jedoch mit einer zusätzlichen Vorbehandlung der Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum. Die Tumorzelllinien TY82 und HepG2 wurden zunächst 24 Stunden mit 5 μ M Olaparib behandelt, bevor sie für weitere 24 Stunden mit NK-Zellen koinkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben, mit AnnexinV und 7-AAD zur Untersuchung apoptotischer und nekrotischer Zellpopulationen gefärbt. Gleichzeitig wurden die Zellen mikroskopisch untersucht.

Auch unter diesen Versuchsbedingungen war bereits nach 2 Stunden Koinkubation eine markante Veränderung in der Zellmorphologie der Tumorzellen zu erkennen. Die Tumorzellen lösten sich ohne Einsatz von Trypsin vom Boden der Kulturplatte, sie erschienen deutlich kleiner und runder als zu Beginn des Versuches und waren morphologisch kaum noch von den NK-Zellen zu unterscheiden (siehe Abbildung 35).

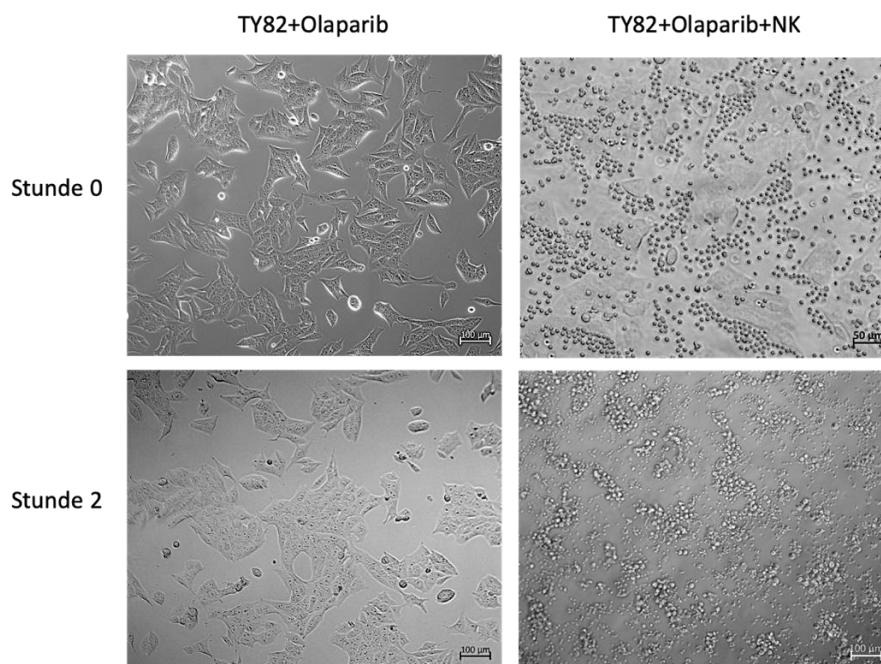


Abbildung 35: Mikroskopische Aufnahmen der Tumorzelllinie TY82 nach einer 24-stündigen Olaparib-Behandlung. Die Darstellungen zeigen die Tumorzellen allein und direkt nach Beginn der Koinkubation (Stunde 0) mit den NK-Zellen und nach 2 Stunden. Maßstab 100 μ m.

Schaut man sich die Werte des Experimentes der Facs-Analyse an (Abbildung 36 A), kann man erkennen, dass die TY82-Zellen nach 24 Stunden allein eine Zell-Viabilität von knapp 95% aufweisen, eine Vorbehandlung mit Olaparib reduzierte die Viabilität leicht auf etwa 85%. Früh- und spät-apoptotische Zellen fielen auf unter 5%. Allerdings

stieg bei einer Vorbehandlung der Tumorzellen allein der nekrotische Wert signifikant auf über 8%. Im Gegensatz dazu führte die Koinkubation mit NK-Zellen (ohne Vorbehandlung) zu einem drastischen Rückgang der Viabilität auf unter 5%. Dies entspricht einer signifikanten Reduktion von nahezu 90%. Gleichzeitig stieg der Anteil früh-apoptotische Zellen auf über 20%, spät-apoptotische Zellen stiegen sogar signifikant auf über 70% und nekrotische Zellen bleiben konstant niedrig auf etwa 5%. Eine 24-stündige Vorbehandlung mit 5 μ M Olaparib vor der NK Zell Koinkubation führte zu einem nahezu identischen Bild: Die Zellviabilität sank ebenfalls auf unter 10% mit einem Anstieg an früh-apoptotischen Zellen auf nahezu 30% und spät-apoptotischen Zellen auf über 60%. Auch hier blieb der Anteil nekrotischer Zellen konstant niedrig bei etwa 5%.

Für die Tumorzelllinie HepG2 zeigte sich ein differenziertes Bild (Abbildung 36 B): Bei den unbehandelten Tumorzellen allein nach 24 Stunden lag die Viabilität der Zellen bei etwa 60%. Früh-apoptotische Zellen wiesen einen Anteil von etwa 8%, spät-apoptotische Zellen über 22% auf. Nekrotische Zellen machten nur knapp je 5% der Zellen aus. Nach einer 24-stündigen Vorbehandlung mit Olaparib war ein Viabilitäts-Rückgang auf rund 40% zu erkennen, begleitet von einem Anstieg der früh-apoptotischen Zellen auf 14%, der spät-apoptotischen Zellen auf 40%. Die Anteile nekrotischer Zellen blieben auch hier konstant bei etwa 5%. Wurden die Tumorzellen mit NK-Zellen koinkubiert, fiel die Viabilität signifikant auf 20%. Parallel dazu war ein signifikanter Anstieg früh-apoptotischer Zellen auf über 20%, sowie spät-apoptotischer Zellen auf über 40% zu beobachten. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb mit etwa 8% weitgehend unverändert. Bei einer Vorbehandlung mit dem PARP-Inhibitor und anschließender Koinkubation der Tumorzellen mit den NK-Zellen verblieben rund 40% der Tumorzellen in einem vitalen Zustand. Der Anteil der früh-apoptotischen Zellen stieg leicht auf etwa 20%, während der Anteil an spät-apoptotischen Zellen leicht auf etwa 30% sank. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb auch hier unverändert.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass, wie bereits in Kapitel 4.1.1 gezeigt, die Koinkubation mit Tumor- und NK-Zellen einen großen Einfluss auf die Viabilität der Tumorzellen hatten. Besonders die apoptotischen Werte stiegen und gaben ein gutes Bild vom Untergang der Tumorzellen wieder. Besonders der große Anstieg der sonst sehr resistenten Tumorzelllinie TY82 in ihren spät-apoptotischen Werten ist von großem Interesse. Allerdings zeigte eine Vorbehandlung mit 5 μ M Olaparib für 24 Stunden keinen synergistischen Effekt auf die Zytotoxizität, sondern war vergleichbar mit der Koinkubation allein.

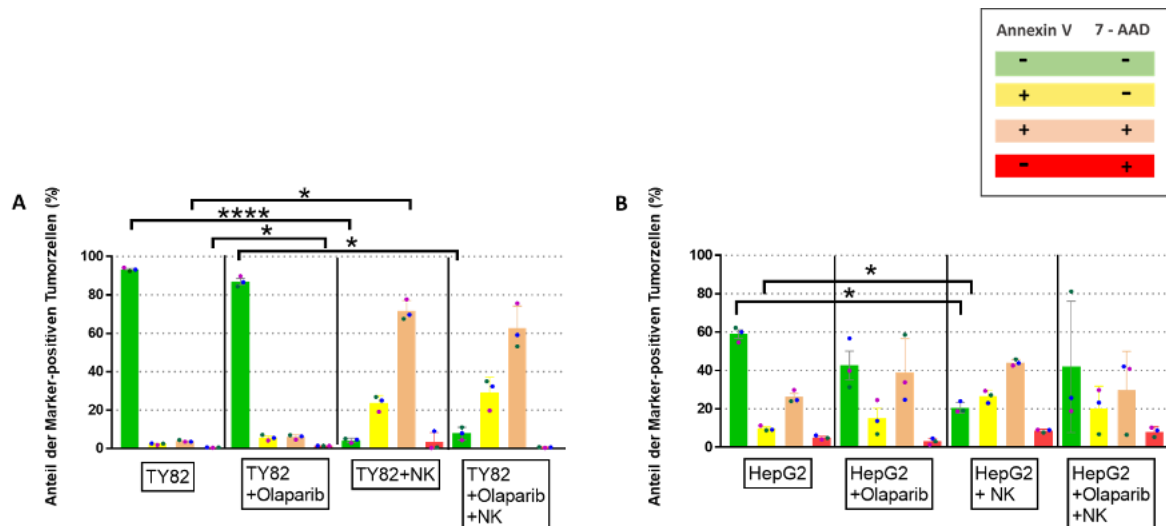


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Marker nach 24-stündiger Olaparibbehandlung (5 μ M) und darauffolgender 24-stündigen Koinkubation der Tumorzellen mit NK-Zellen. Die verschiedenfarbigen Kreise (●) repräsentieren die verschiedenen biologischen Replikate. Die Farben der Balken markieren Viabilität (grün), Frühe Apoptose (gelb), Späte Apoptose (beige) und Nekrose (rot). Die Graphik zeigt die Ergebnisse für die TY82-Zellen (A) und HepG2-Zellen (B) allein und mit NK-Zellen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test mit Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

4.1.6.3 Degranulationsanalysen mit CD107a zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Tumorzelllinien mit und ohne Olaparib-Behandlung

In diesem Versuch wurde das Degranulationsverhalten von NK-Zellen in Koinkubation mit zwei verschiedenen Tumorzelllinien (TY82 und HepG2) nach einer 24-stündigen Olaparibbehandlung untersucht. Ziel war es, detaillierter zu analysieren, wie NK-Zellen auf Tumorkontakt reagieren und ob eine Vorbehandlung mit Olaparib diesen Prozess beeinflusst.

CD107a ist ein sensibler Marker für die Aktivierung bzw. Degranulation von NK-Zellen, bei dem von NK-Zellen zytotoxische Granula freigesetzt werden und so aktiv auf andere Zellen reagieren. Nähere Informationen über den Versuchsablauf sind dem Kapitel 3.2.14 zu entnehmen. Wie schon in Kapitel 4.1.3 wurde bei der Auswertung und dem Gating nur das NK-Gate (CD45⁺) berücksichtigt. Die NK-Zellen wurden sowohl allein als auch nach Koinkubation mit Tumorzellen untersucht, jeweils mit und ohne vorheriger 24-stündige Behandlung mit Olaparib. Basierend auf vorherigen Ergebnissen (siehe Kapitel 4.1.3), die bereits nach vier Stunden eine signifikante Degranulation zeigten, wurde in diesem Versuch eine verkürzte vierstündige Koinkubationszeit gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 37 dargestellt. Die Koinkubation der NK-Zellen mit der Tumorzelllinie TY82 führte zu einem deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg der CD107a-Expression im Vergleich zu den NK-Zellen in Monokultur. Dieser Effekt war nach einer 24-stündigen Olaparib-Behandlung

ebenfalls zu erkennen. Die Werte waren signifikant ausgeprägt, jedoch vergleichbar mit den Werten der Degranulation während der Koinkubation ohne Olaparib-Behandlung (Abbildung 37 A). Ein ähnliches Ergebnis konnte auch bei der Zelllinie HepG2 beobachtet werden: Die CD107a-Expression war in der Koinkubation signifikant erhöht im Vergleich zu NK-Zellen ohne Tumorzellen. Eine Olaparib-Behandlung führte ebenfalls zu signifikanten Werten allerdings ohne zusätzlichen Effekt. Die Degranulationsrate blieb auf einem ähnlichen Niveau von etwa 60-70% (Abbildung 37 B).

Zusammenfassend lassen diese Daten erkennen, dass eine 24-stündige Vorbehandlung der Tumorzellen mit Olaparib keinen synergistischen Effekt auf die Degranulation von NK-Zellen bewirkt.

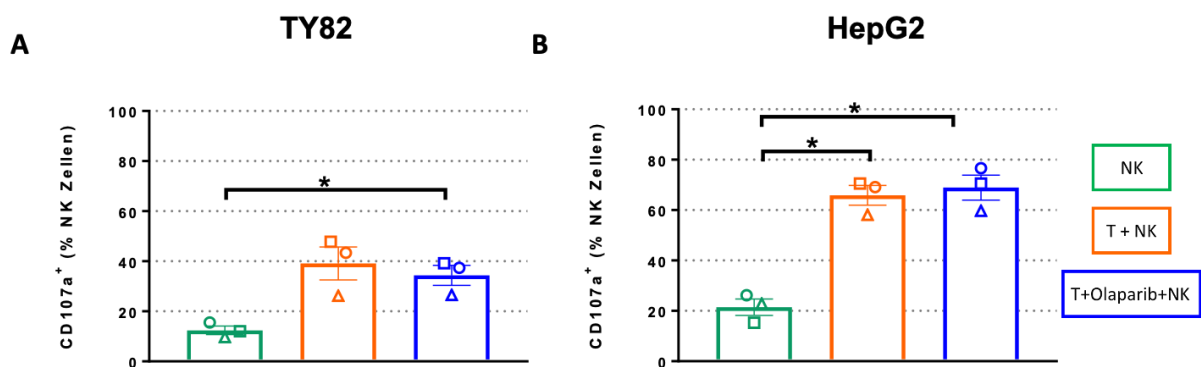


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der CD107a-Expression auf NK-Zellen nach einer 24-stündigen Vorbehandlung der Tumorzellen mit Olaparib und anschließender 4-stündiger Koinkubation. Kreise (○), Vierecke (□) und Dreiecke (Δ) stellen die unterschiedlichen biologischen Replikate dar. Die Graphik zeigt die Degranulation von NK-Zellen in Koinkubation mit der Tumorzelllinie TY82 (A) und HepG2 (B). Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test, dabei gilt * $p < 0,05$.

4.1.6.4 NK-Zell-Zytotoxizität nach Kontakt mit Tumorzellen in Low- und High-Glukose-Bedingungen zeigen deutlichen Effekt nach vierstündiger Koinkubation, jedoch ohne synergistischen Effekt von Olaparib, Cisplatin oder Etoposid

In diesem Versuch wurde die Tumorzelllinie TY82 in zwei unterschiedlichen Kulturmedien untersucht: Das Low-Glukose-Medium hatte einen Glukoseanteil von 1 g/L, im Gegensatz zu dem Standard-Medium mit 4,5 g/L (High Glucose). Zunächst erfolgte eine 24-stündige Vorbehandlung mit Olaparib (5 μ M), Cisplatin (100 nM) oder Etoposid (100 nM), bevor TY82-Zellen 4 Stunden in Koinkubation mit NK-Zellen genommen wurden. Die Verkürzung der Koinkubationszeit auf 4 Stunden basierte auf vorangegangenen Erkenntnissen, wonach dieser Zeitraum ausreichend ist, um

zytotoxische Effekte nachzuweisen. Anschließend wurden die Zellen, wie in Kapitel 3.2.13 beschrieben, auf AnnexinV und 7-AAD gefärbt.

Vorbehandlung mit Olaparib:

Wie in Abbildung 38 zu erkennen ist, zeigten die TY82-Zellen nach 4 Stunden Inkubation ohne NK-Zellen, sowohl unbehandelt als auch nach einer 24-stündigen Olaparibbehandlung, eine Zell-Viabilität von fast 100%. Früh- und spät-apoptotische Zellen, sowie nekrotische Zellen lagen unter 5%. Ganz anders verhält es sich in der Koinkubation mit den NK-Zellen: Hier sank die Viabilität signifikant auf unter 20%, während der Anteil früh-apoptotischer Zellen auf über 25% und spät-apoptotischer Zellen auf fast 50% anstiegen. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb konstant auf etwa 5%. Nach einer Vorbehandlung mit 5 μ M Olaparib für 24 Stunden konnte ein vergleichbares Bild beobachtet werden: die Viabilität fiel signifikant auf unter 10%. Früh-apoptotische Zellen stiegen signifikant auf über 20% und spät-apoptotische Zellen signifikant auf 60%, während die nekrotischen Zellen weiterhin bei 5% lagen. Wurde derselbe Versuch mit TY82-Zellen im Low-Glucose-Medium durchgeführt, ergab sich ein nahezu identisches Ergebnis. Auch hier führte die Vorbehandlung mit Olaparib nicht zu einer erhöhten Zytotoxizität im Vergleich zur Koinkubation mit NK-Zellen ohne Vorbehandlung.

Vorbehandlung mit Cisplatin

Wie in Abbildung 38 dargestellt, erreichten die TY82-Zellen nach 4 Stunden Inkubation, sowohl unbehandelt als auch nach einer 24-stündigen Cisplatinbehandlung (100 nM) eine Zell-Viabilität von nahezu 100%. Früh- und spät-apoptotische Zellen sowie nekrotische Zellen machen nur knapp unter 5% der behandelten und unbehandelten Zellen aus. Im Gegensatz dazu führte die Koinkubation zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität auf unter 20%, begleitet von einem deutlichen Anstieg früh-apoptotischer Zellen auf über 25% und spät-apoptotischer Zellen auf fast 50%. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb konstant auf etwa 5%. Nach einer Vorbehandlung mit Cisplatin für 24 Stunden zeigte sich ein vergleichbares Bild: die Viabilität fiel signifikant auf unter 10%. Früh-apoptotische Zellen stiegen auf über 30% und spät apoptotische Zellen signifikant auf 50%, während die nekrotischen Zellen weiterhin bei 5% lagen. Dieses Muster konnte auch in Low-Glucose-Medium beobachtet werden, wobei die statistische Signifikanz der Unterschiede gegenüber den Kontrollgruppen teils höher ausfiel. Dennoch führte die Cisplatin-Vorbehandlung in keinem Medium zu einer stärkeren Zytotoxizität als die NK-Zell-Koinkubation allein.

Vorbehandlung mit Etoposid

Schaut man sich die Tumorzellen an, die eine Vorbehandlung mit Etoposid erfuhren, fällt auf, dass die Viabilitätsrate nur ca. 85% betrug im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch hier machten früh- und spät-apoptotische sowie nekrotische Zellen nur knapp unter 5% der behandelten und unbehandelten Zellen aus. In Kombination mit NK-Zellen sank die Viabilität signifikant auf unter 20%, früh-apoptotische Zellen stiegen signifikant auf über 25%, spät-apoptotische Zellen erreichten Werte von 50-

60% und nekrotische Zellen blieben auf ihrem niedrigen Niveau von 5%. Waren die Zellen in der Koinkubation mit Etoposid vorbehandelt, fiel die Viabilität auf unter 10%, die früh-apoptotische und spät-apoptotische Zellen stiegen beide signifikant auf über 25% bzw. auf 60%, während die nekrotischen Zellen auf ihrem niedrigen Niveau von 5% im Vergleich zu den vorbehandelten Tumorzellen ohne NK-Zellen blieben. In Low-Glucose-Medium konnten ähnliche Ergebnisse beobachtet werden, jedoch mit teilweise höherer Signifikanz. Die Viabilität der Tumorzellen allein zeigte in diesem Medium 95%, früh- und spät-apoptotische Zellen sowie nekrotische Zellen machten hier nur knapp 5% aus. Waren die Zellen mit Etoposid vorbehandelt, kam es im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu einer signifikanten Reduzierung der viablen Zellen und gleichzeitig zu einem signifikanten Anstieg der frühen Apoptose und der nekrotischen Zellen. Eine anschließende Koinkubation ohne Vorbehandlung führte zu einem signifikanten Rückgang der Viabilität auf unter 20% im Vergleich mit den unbehandelten Tumorzellen allein. Früh-apoptotische Zellen stiegen signifikant auf über 30% und spät-apoptotische Zellen auf fast 45%. Nekrotische Zellen stiegen leicht, bleiben aber auf ihrem niedrigen Niveau. Bei einer Vorbehandlung mit Etoposid für 24 Stunden vor der NK-Zell-Koinkubation fiel die Viabilität signifikant auf unter 20%. Früh-apoptotische Zellen stiegen auf über 30%, spät-apoptotische Zellen signifikant auf fast 50%. Die nekrotischen Zellen stiegen zwar signifikant, blieben aber auf einem niedrigen Niveau von unter 10%.

Abbildung 39 zeigt mikroskopische Aufnahmen der TY82-Zellen, sowohl unbehandelt als auch nach einer Vorbehandlung mit Cisplatin, Etoposid und Olaparib und anschließender 4-stündiger Koinkubation mit NK-Zellen. Es waren keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu erkennen. Das Erscheinungsbild entspricht im Wesentlichen dem in Abbildung 33 gezeigten Darstellungen.

Zusammenfassend bestätigen diese Ergebnisse, dass bereits eine 4-stündige Koinkubation mit NK-Zellen eine signifikante Zytotoxizität gegenüber TY82-Zellen auslöst, erkennbar vor allem an den signifikant höheren spät-apoptotischen Anstiegen. Eine Vorbehandlung mit Olaparib, Cisplatin und Etoposid führte jedoch zu keinem synergistischen Effekt auf die Zytotoxizität in Kombination mit einer Koinkubation. Im Low-Glucose-Medium führte die Behandlung mit Olaparib und Etoposid im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen zu einer Erhöhung der apoptotischen oder nekrotischen Werte, wobei jedoch kein zusätzlicher synergistischer Effekt bei kombinierter Anwendung mit NK-Zellen festgestellt werden konnte.

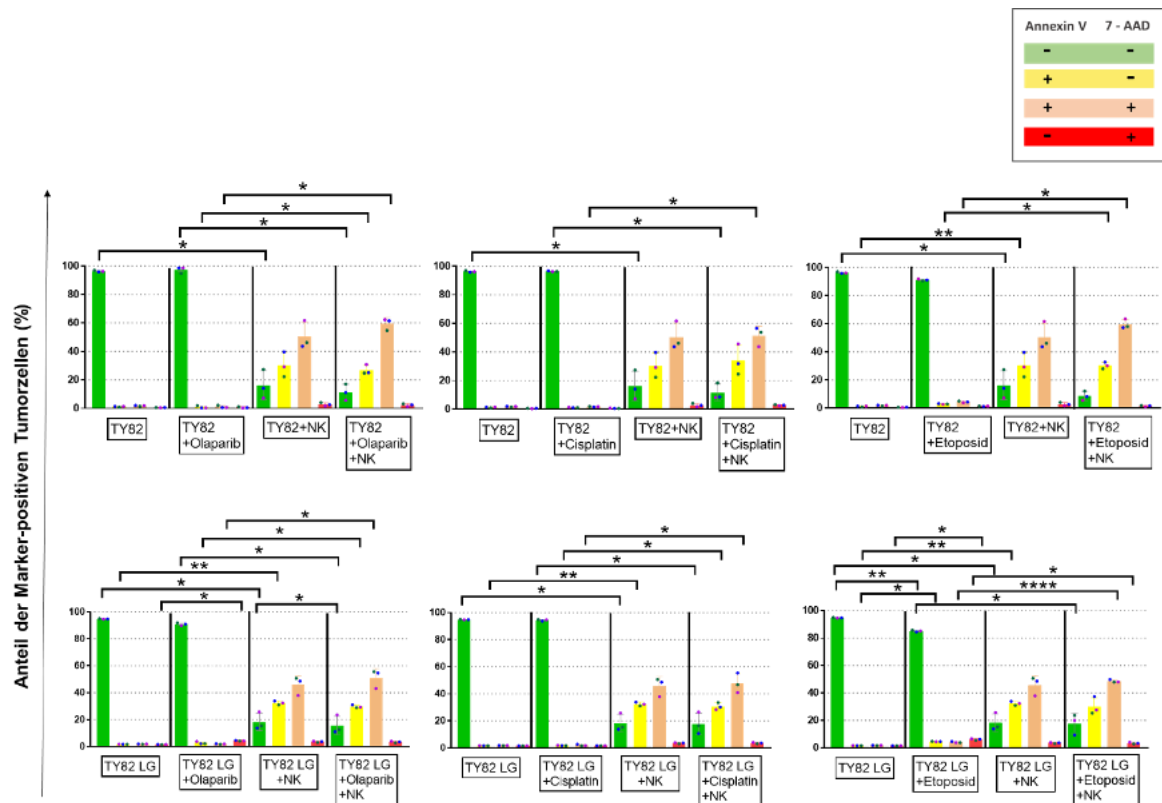


Abbildung 38: Durchflusszytometrische Analyse der Apoptose-Marker AnnexinV/7-AAD nach Behandlung mit den Chemotherapeutika Cisplatin (100 nM), Etoposid (100 nM) und Olaparib (5 μ M) in Medien mit unterschiedlichem Glukosegehalt (High-Glucose 4,5G/L; Low-Glucose 1g/L). Kreise (●), repräsentieren die verschiedenen biologischen Replikate. Die Farben markieren Viabilität (grün), Frühe Apoptose (gelb), Späte Apoptose (beige) und Nekrose (rot). Dargestellt ist der Vergleich der AnnexinV/7-AAD-Färbung bei der Tumorzelllinie TY82 unter verschiedenen Versuchsbedingungen: unbehandelt, nach Vorbehandlung, in Kombination mit NK-Zellen in der Koinkubation auch mit und ohne Vorbehandlung. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

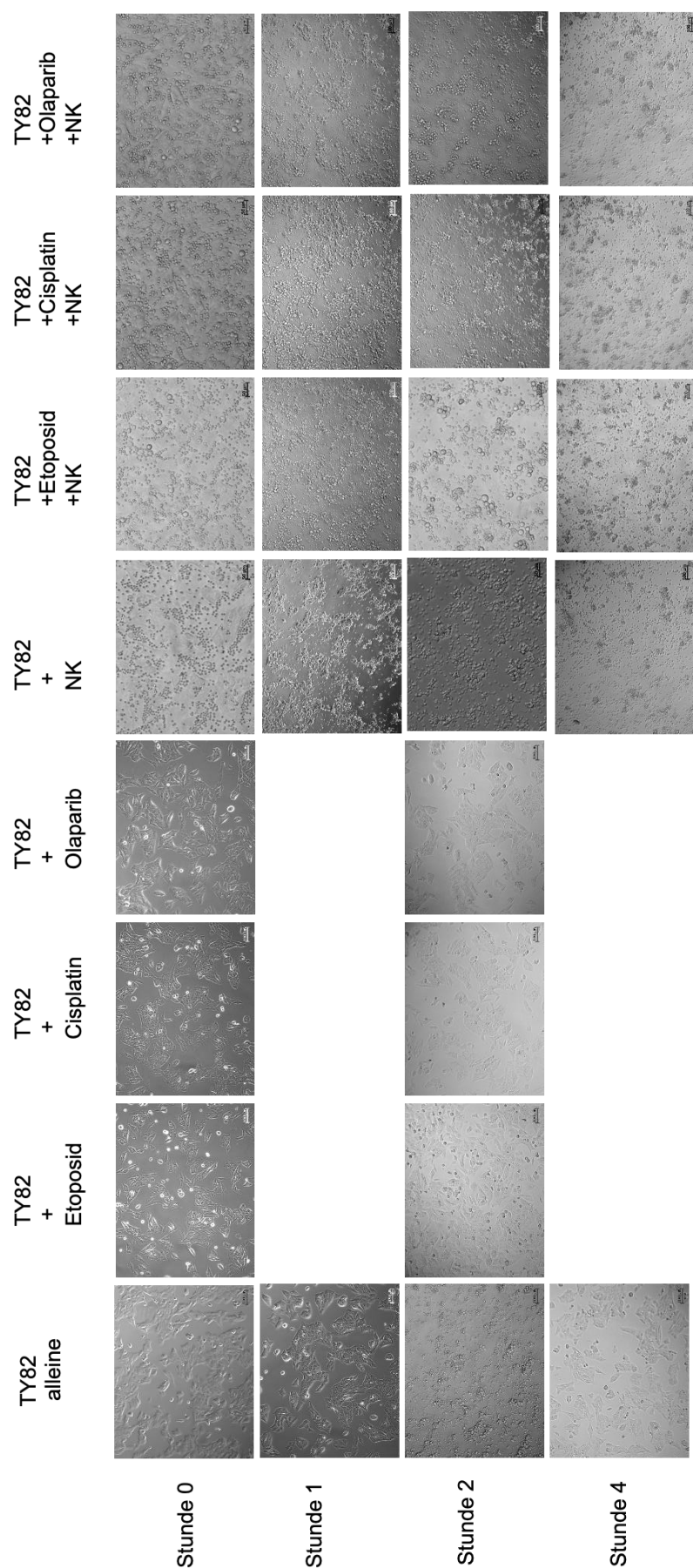


Abbildung 39: Vergleich der Tumorzelllinie TY82 mit und ohne 24-stündige Vorbehandlung mit Etoposid, Cisplatin und Olaparib und anschließender vierstündiger Koinkubation mit NK-Zellen. Maßstab 50-100 μm .

4.1.7 Quantifizierung der Proteinkonzentrationen im Überstand nach Olaparib-Behandlung und Koinkubation zeigt signifikante Erhöhung von Granzym A, Granzym B und GM-CSF

Zur Untersuchung der immunmodulatorischen Effekte der PARP-Inhibition durch Olaparib in Kombination mit einer NK-Zell-Koinkubation führten wir eine Quantifizierung verschiedener Proteine wie Zytokine und Effektormoleküle aus Überständen von Koinkubations-Experimenten durch. Untersucht wurden hierbei die Tumorzelllinien HepG2 und TY82, sowohl unbehandelt als auch nach einer 24-stündigen Olaparibbehandlung (100 μ M). Die NK-Zellen wurden aus drei verschiedenen Buffycoats isoliert. Die Analyse der Proteinkonzentrationen erfolgte wie in Kapitel 3.2.22 beschrieben.

Die Tumorzelllinie TY82 zeigte in den Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokinen IL-2 und IL-6 und in den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-10 und IL-13 keine signifikanten Unterschiede, weder zwischen den unbehandelten Zellen und der Koinkubation noch nach Olaparib-Vorbehandlung (siehe Abbildung 40). Im Gegensatz dazu ergab sich bei der Sekretion der Effektormoleküle Granzymen A, Granzymen B und Perforin ein signifikanter Unterschied. Sowohl die Koinkubation mit NK-Zellen als auch die Kombination mit einer Olaparib-Behandlung führten zu einer signifikanten Erhöhung der Granzym-Level, wobei Granzym B besonders deutlich anstieg. GM-CSF, der Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierende Faktor, der ebenfalls als ein proinflammatorisches Zytokin dient, war sowohl bei TY82-Zellen als auch bei TY82-Zellen in Koinkubation mit NK-Zellen signifikant erhöht. In Abbildung 41 sind die Ergebnisse der Tumorzelllinie HepG2 dargestellt. Im Gegensatz zur TY82-Zelllinie wurden hier signifikante Erhöhungen bei den antiinflammatorischen Zytokinen IL-4, IL-10 und IL-13 detektiert. IL-10 war sowohl für HepG2 allein, in Koinkubation und bei einer Vorbehandlung mit Olaparib erhöht. IL-13 war für HepG2 allein und in seiner Koinkubation erhöht, IL-4 zeigt eine signifikante Erhöhung des antiinflammatorischen Zytokins, wenn die Tumorzellen mit Olaparib vorbehandelt waren. Die proinflammatorischen Zytokine führten hier zu keinerlei signifikanter Erhöhung. Für die Sekretion der Effektormoleküle Granzyme A, Granzyme B und Perforin in den HepG2-Zellen ergab sich ein ähnlich signifikanter Unterschied wie bei den TY82-Zellen: Hier gibt es bei beiden Granzymen A und B einen signifikanten Unterschied zwischen HepG2-Zellen allein und in Koinkubation mit NK-Zellen. Sind die Zellen mit Olaparib vorbehandelt, kommt es ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung von Granzyme B. Das proinflammatorische Zytokin GM-CSF wies sowohl bei HepG2 als auch bei TY82 signifikante Unterschiede auf, insbesondere in der Koinkubation mit NK-Zellen sowie nach zusätzlicher Vorbehandlung mit Olaparib. Darüber hinaus konnte eine signifikante Erhöhung von IFN- γ beobachtet werden, wenn die Tumorzellen mit Olaparib vorbehandelt und danach koinkubiert wurden. Das pro-inflammatorische Zytokin MIF war in keiner Zelllinie und deren Koinkubation erhöht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Olaparib in der Tumorzelllinie TY82 keine ausgeprägten pro oder anti-inflammatorische Effekte induzierte, während bei HepG2-Zellen eine deutlich effektivere Wirkung des PARP-Inhibitors erkennbar war. Unabhängig davon führte die Koinkubation mit NK-Zellen in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Erhöhung der Effektormoleküle Granzyme A und Granzyme B, sowie des pro-inflammatorischen Zytokins GM-CSF. Diese Ergebnisse unterstreichen die immunaktivierende Wirkung der NK-Zell-Koinkubation, während der Zusatz von Olaparib nur in bestimmten Kontexten zusätzliche Effekte erzielte.

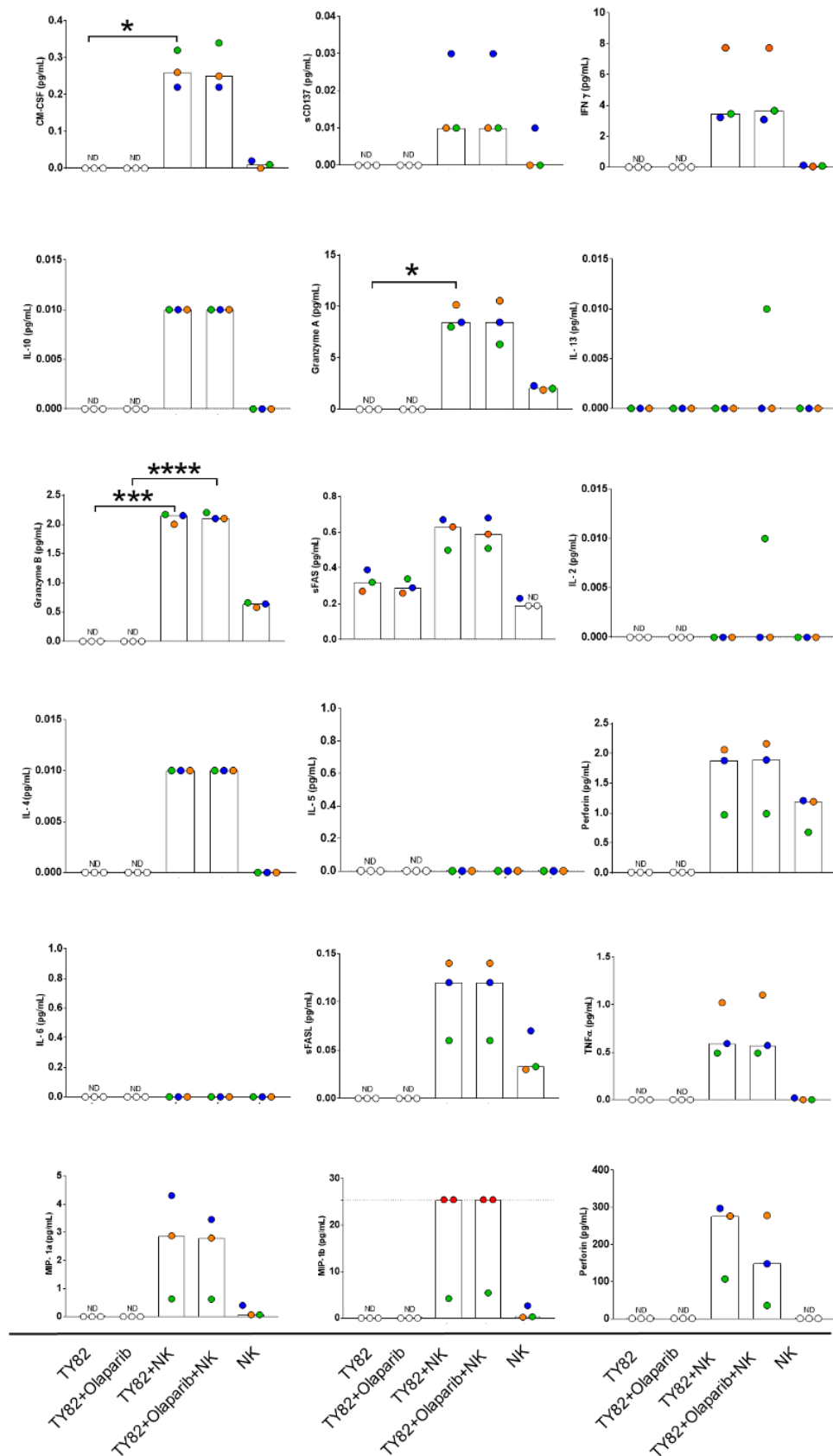


Abbildung 40: Proteinkonzentrationen in Überständen von Tumorzellen TY82 und NK-Zellen allein und in Koinkubation mit und ohne Vorbehandlung mit Olaparib. Die Proteinsekretion wurde aus dem Überstand von einer Koinkubation mit TY82-Zellen und NK-Zellen bestimmt (n=3). Werte, unter der Detektionsgrenze wurden mit ND (nicht detektierbar) und weiß, Werte über der Bestimmungsgrenze mit rot und einer gestrichelten Linie markiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

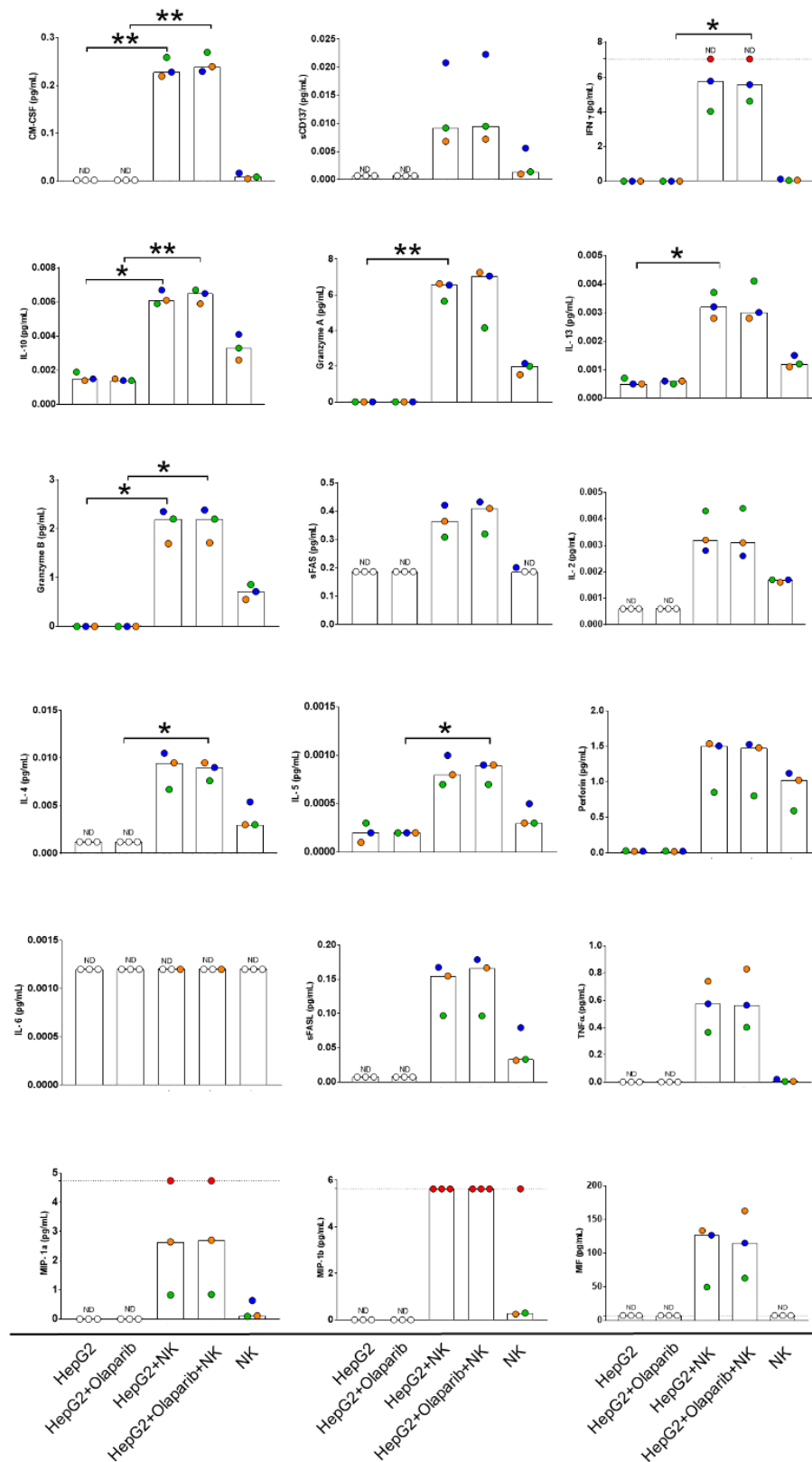


Abbildung 41: Proteinkonzentrationen in Überständen von Tumorzellen HepG2 und NK-Zellen allein und in Koinkubation mit und ohne Vorbehandlung mit Olaparib. Die Proteinsekretion wurde aus dem Überstand von einer Koinkubation mit HepG2-Zellen und NK-Zellen bestimmt (n=3). Werte, unter der Detektionsgrenze wurden mit ND (nicht detektierbar) und weiß, Werte über der Bestimmungsgrenze mit rot und einer gestrichelten Linie markiert. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

4.1.8 Der Poliovirus Rezeptor und seine Expression während der Koinkubation

Der Poliovirus Rezeptor (PVR), auch bekannt als CD155, wird während der Tumorprogression verstärkt hochreguliert (siehe Einleitung Kapitel 1.2). In Anbetracht seiner Rolle in der Tumorummunologie untersuchten wir, ob nicht nur die NK-Zellen durch die Koinkubation beeinflusst werden, sondern auch die Expression von PVR auf den Tumorzellen verändert wird. Ziel war es, potenzielle immunologische Wechselwirkungen auf Ebene der Liganden-Expression besser zu verstehen.

Für diese Versuchsreihe wurde zuerst eine Isotypenkontrolle, Antikörper-Titration und ein Test zur Fluoreszenzüberstrahlung durchgeführt. Zudem wurde eine veränderte Gating-Strategie für die PVR-Expression auf Tumorzellen angewendet. Nähere Informationen sind Kapitel 3.2.16 zu entnehmen.

4.1.8.1 Koinkubation von Tumorzellen und NK-Zellen führt zu einer signifikanten PVR-Expressionsänderung

Um herauszufinden, ob es nach einer Koinkubation zu einer PVR-Expressions-Änderung auf den Tumorzellen kommt, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt. Parallel erfolgte eine Vitalitätsfärbung mit Zombie Violet, um tote Zellen zuverlässig ausschließen zu können. Der Ablauf des Versuches ist in Abschnitten 3.2.16 und 0 näher beschrieben. Im ersten Schritt wurde eine 24-stündige Koinkubationsdauer gewählt. Die Tumorzellen TY82 und HepG2 wurden gemeinsam mit NK-Zellen kultiviert und anschließend die PVR-Expression in den überlebenden Tumorzellen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 42 zusammengefasst. Wie in Abbildung 42 A zu erkennen ist, zeigte sich eine deutliche Reduzierung der PVR-Expression in beiden Zelllinien, bei TY82-Zellen höher als bei den HepG2-Zellen. Die MeFI-Werte bestätigten diesen Befund (Abbildung 42 B) mit einem stärkeren Rückgang der medianen Fluoreszenzintensität bei TY82-Zellen im Vergleich zu den HepG2-Zellen. Allerdings offenbart Abbildung 42 C ein entscheidendes Problem: Nach 24-stündiger Koinkubation war der Großteil der Tumorzellen Zombie Violet-positiv, d.h. diese Zellen waren nicht mehr vital. Die geringe Anzahl der überlebenden Zellen schränkte die Aussagekraft der Ergebnisse erheblich ein.

Aufgrund dieser Limitation wurde die Koinkubationsdauer auf 2 Stunden gekürzt. Wie bereits in vorangegangenen mikroskopischen Beobachtungen festgestellt (siehe Kapitel 4.1.1), traten erste Anzeichen eines zellulären Zerfalls bereits nach 2 Stunden auf, weshalb diese Zeitspanne als neuer Endpunkt gewählt wurde. Die Ergebnisse der zweistündigen Koinkubation sind in Abbildung 43 verdeutlicht. Bei den Ergebnissen in Abbildung 43 A war nun ein deutlich geringerer Unterschied in der PVR-Expression auf den Tumorzellen im Vergleich zur 24-stündigen Koinkubation zu erkennen. Während der Anteil PVR-positiver TY82-Zellen zuvor noch unter 5% lag, lag dieser Wert nun bei 78%. Bei den HepG2-Zellen war ein signifikanter Rückgang auf 84% zu beobachten. Die MeFI-Werte (Abbildung 43 B) zeigten für beide Zelllinien eine

gleichmäßig ausgeprägte Reduktion der PVR-Expression, allerdings ohne eine Signifikanz. Die reduzierte Koinkubationszeit führte ebenfalls zu einer Steigerung der Anzahl der lebenden Zellen (Zombie Violet). Mehr vitale Zellen waren vorhanden, um eine sichere Interpretation zu ermöglichen. Bei TY82-Zellen sank der Anteil lebender Zellen im Vergleich zur Mono-Kultur von nahezu 100% in der Koinkubation auf 28%, während HepG2 auf knapp 65% gestiegen war (Abbildung 43).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass eine Koinkubation von 24 Stunden zu einem nahezu vollständigen Untergang der Tumorzellen führte und daher keine verlässliche Aussage zur PVR-Expression zuließ. Die verkürzte Koinkubation von 2 Stunden ermöglichte hingegen eine verlässliche Aussage über die PVR-Expression. Dabei ließ sich eine signifikante Reduktion der PVR-Expression bei den HepG2-Zellen feststellen, während bei den TY82-Zellen ein vergleichbarer Trend erkennbar war, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte.

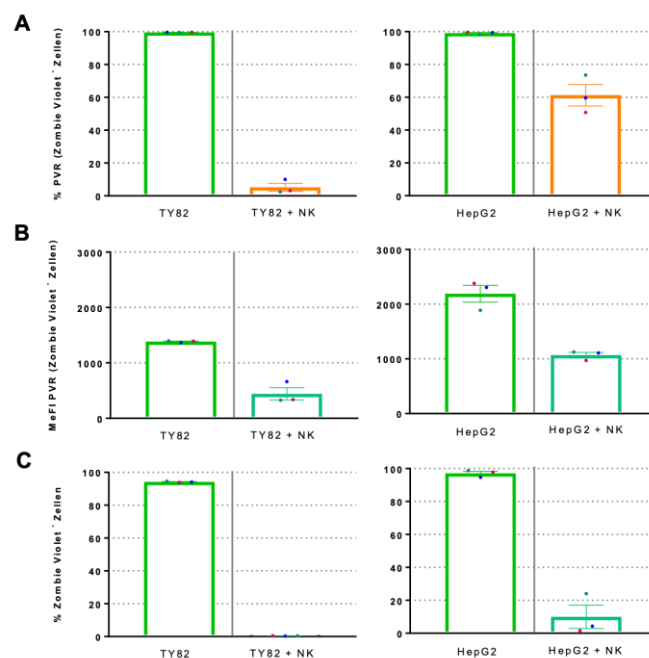


Abbildung 42: PVR-Expression nach 24-stündiger Koinkubation von TY82- und HepG2-Zellen mit NK-Zellen Die verschiedenen Farben der Kreise stellen die unterschiedlichen biologischen Replikate dar. Links: TY82-Zellen; rechts: HepG2-Zellen. **(A)** Prozentanzahl der PVR-Expression in lebenden Tumorzellen. **(B)** Mediane Fluoreszenzintensität (MeFI) der PVR positiven Tumorzellen. **(C)** Anzahl lebender Tumorzellen nach 24 Stunden Koinkubation. Aufgrund der unbrauchbaren Ergebnisse wurde keine statistische Auswertung durchgeführt.

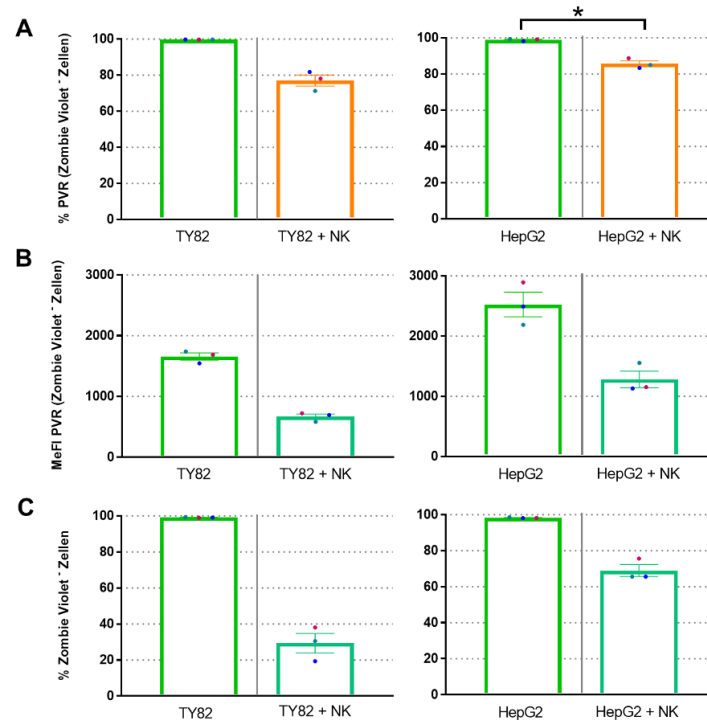


Abbildung 43: PVR-Expression nach 2-stündiger Koinkubation von TY82- und HepG2-Zellen mit NK-Zellen Die verschiedenen Farben der Kreise stellen die unterschiedlichen biologischen Replikate dar. Links: TY82-Zellen; rechts: HepG2-Zellen. **(A)** Prozentanzahl der PVR-Expression in lebenden Tumorzellen. **(B)** Mediane Fluoreszenzintensität (MeFI) der PVR positiven Tumorzellen. **(C)** Anzahl lebender Tumorzellen nach 2 Stunden Koinkubation. Die statistische Auswertung erfolgte mittels paired t-Test, dabei gilt $*p < 0,05$.

4.1.8.2 Koinkubation von Tumorzellen und NK-Zellen führt zu einer signifikanten PVR-Expressionsänderung ohne synergistischen Effekt von Etoposid

Zu weiteren Untersuchungen der PVR-Expression wurde ein kombinierter Ansatz aus Chemotherapeutikum und NK-Zell-Koinkubation gewählt. Hierzu erfolgte eine 24-stündige Vorbehandlung der Tumorzellen mit Chemotherapeutikum Etoposid (100 nM), gefolgt von einer zweistündigen Koinkubation. Alle Versuche wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt. Aufgrund der in Abschnitt 4.1.8.1 gezeigten hohen Zytotoxizität längerer Koinkubationszeiten wurde auch hier die Inkubationsdauer auf zwei Stunden begrenzt, um eine ausreichende Zellviabilität sicher zu stellen.

Schaut man sich die Werte der PVR-Expression in lebenden Tumorzellen in Abbildung 44 A an, zeigte sich bei den TY82-Zellen eine signifikante Reduzierung der PVR-Expression von ca. 30%- unabhängig von einer Vorbehandlung mit Etoposid. Bei den HepG2-Zellen führte die Koinkubation zu einem schwächeren Effekt mit etwa 15% PVR-Reduzierung, ebenfalls ohne Unterschied zwischen behandelten oder unbehandelten Tumorzellen. Die MeFI-Werte in Abbildung 44 B stützen diese

Beobachtung: bei den TY82-Zellen sank die mediane PVR-Fluoreszenzintensität signifikant um etwa 65% nach Koinkubation, unabhängig von der Etoposid-Vorbehandlung. Die HepG2-Zellen konnten eine signifikante Reduzierung unbehandelter Tumorzellen von 39% vorweisen, bei den vorbehandelten Zellen war eine etwas höhere, aber nicht signifikante Reduzierung der MeFI zu beobachten. Die Zellviabilität, dargestellt in Abbildung 44 C, bleibt in Abwesenheit von NK-Zellen hoch: Nahezu 100% bei TY82-Zellen und etwa 95% bei HepG2-Zellen, unabhängig von der Etoposid-Behandlung. Ganz anders verhält es sich jedoch in der Koinkubation mit den NK-Zellen. Diese führt bei den TY82-Zellen zu einem signifikanten Viabilitätsverlust auf etwa 25%, sowohl mit als auch ohne Etoposid. Bei HepG2-Zellen ist der Rückgang weniger stark ausgeprägt und die Viabilität sinkt auf 60%, wobei auch hier keine Verstärkung durch eine Etoposid-Behandlung zu erkennen ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der direkte Kontakt mit NK-Zellen eine moderate Reduktion der PVR-Expression bewirkt, jedoch keine synergistischen Effekte durch eine Vorbehandlung mit Etoposid erzielt werden konnte, weder bei TY82 noch bei HepG2-Zellen.

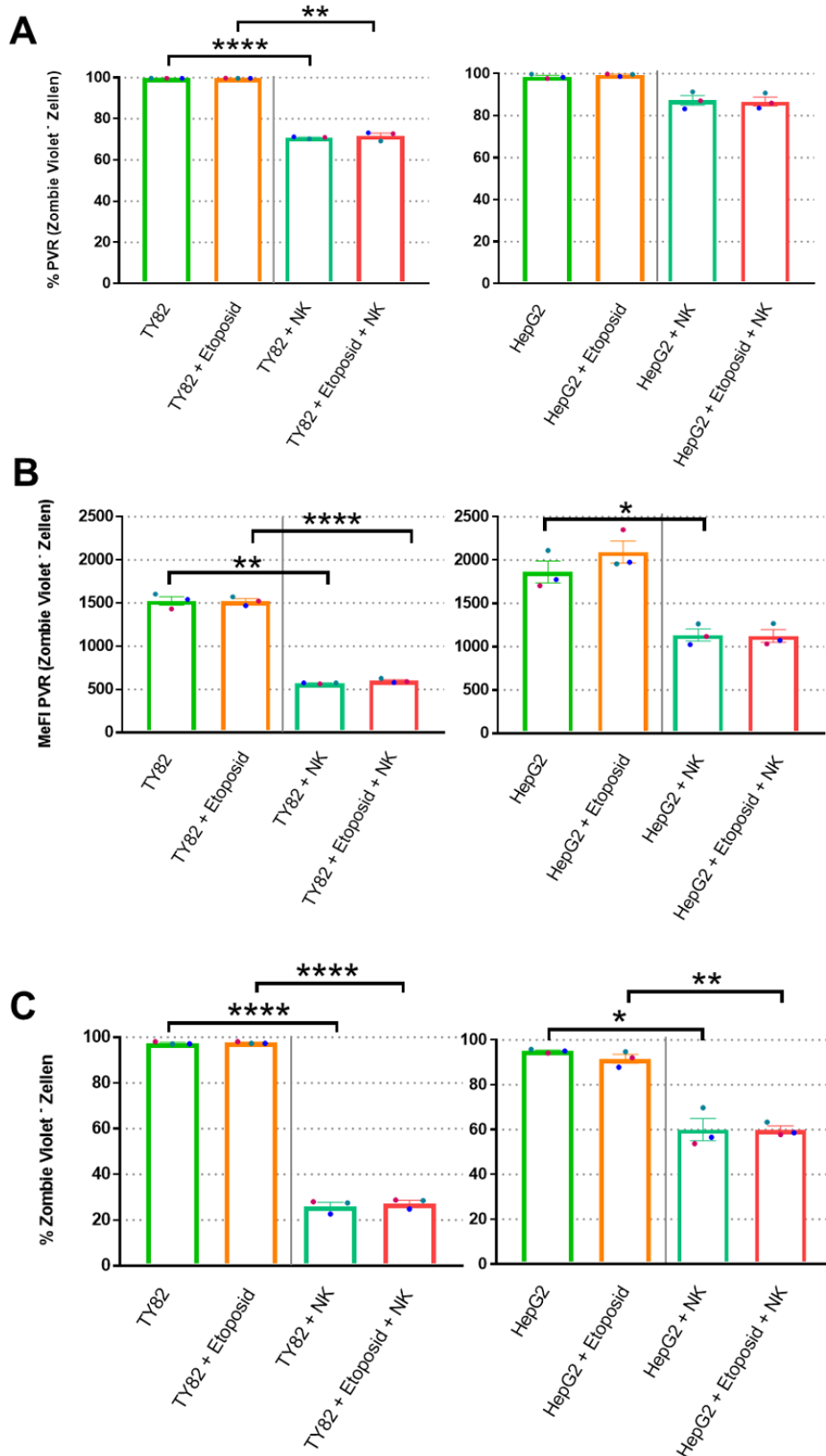


Abbildung 44: PVR-Expression nach 24-stündiger Etoposid-Behandlung und anschließender 2-stündiger Koinkubation von TY82- und HepG2-Zellen mit NK-Zellen. Die verschiedenen Farben der Kreise stellen die unterschiedlichen biologischen Replikate dar. Links: TY82-Zellen; rechts: HepG2-Zellen. **(A)** Prozentanzahl der PVR-Expression in lebenden Tumorzellen. **(B)** Mediane Fluoreszenzintensität (MeFI) der PVR positiven Tumorzellen. **(C)** Anzahl lebender Tumorzellen nach 2 Stunden Koinkubation. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Tukey's multiple comparisons test und Greenhouse-Geisser Korrektur, dabei gilt * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4.2 Etablierung von 3D-Modellen zur Untersuchung der Wirkung von Chemotherapie-Substanzen

Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit an Mikrotumoren aus Patientenmaterial sollte zukünftig ein komplexes dreidimensionales *in vitro*-Zellkultursystem etabliert werden. Diese sollen für Substanztestungen, aber auch für Koinkubationen verwendet werden, ohne dabei auf Patientenmaterial zurückgreifen zu müssen. Die Generierung solcher Sphäroide ist effizient und reproduzierbar. Ziel war es, möglichst große Sphäroide zu erzeugen, ohne jedoch den kritischen Durchmesser von 300 bis 500 µm zu überschreiten, da darüberhinausgehende Größen zu einem hypoxischen Kern führen können (Vinci et al., 2013; Vinci et al., 2012). Die isolierten und aufgereinigten Tumorzellen TY82 und HepG2 wurden zunächst in zweidimensionaler Zellkultur kultiviert und expandiert und bei Konfluenz passagiert. Die so erhaltenen Zellen wurden dann zur Generierung der Sphäroide verwendet. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage. Veränderungen in Morphologie und Dauer der Lebensfähigkeit der Sphäroide wurden kontinuierlich mittels Lichtmikroskopie dokumentiert. Zur Optimierung der Sphäroidbildung wurden 1000, 5000, 10.000, 20.000, 40.000 und 60.000 Tumorzellen in eine 96-Well-Platte ausgesät. Die Entwicklung der Sphäroide wurde bei TY82-Zellen 12 Tage und bei HepG2-Zellen 13 Tage lichtmikroskopisch beobachtet und dokumentiert (siehe Abbildung 45 und Abbildung 46). Es wurden alle Sphäroide in dreifacher Ausführung kultiviert.

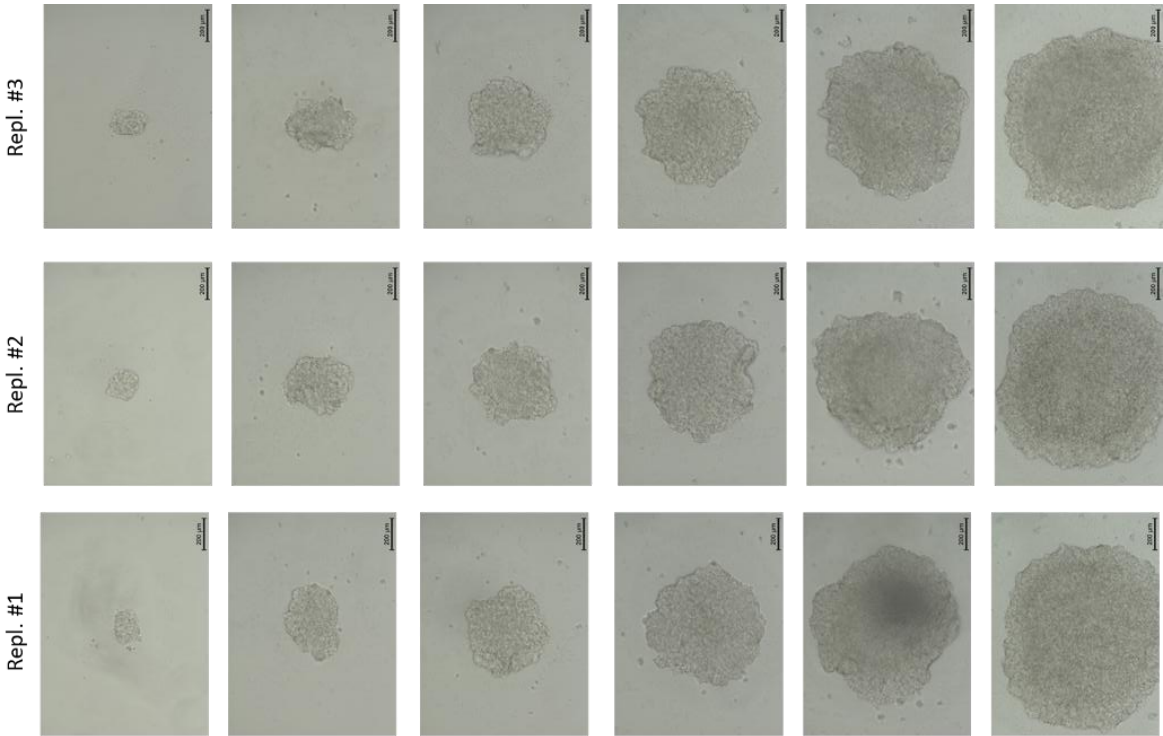
Betrachtet man die Zelllinie TY82 an Tag 1, ist zu erkennen, dass alle Sphäroide schon sehr kompakt zusammenlagen und komplexe Zellaggregate bildeten. Sie zeigten schon direkt eine sphäroid-typische Form. Ein definierter Rand war zunächst nicht bei allen Sphäroiden sichtbar, insbesondere bei niedrigen Zellzahlen. Die Oberfläche wirkte sehr uneben und viele vereinzelte Zellen lagen im Außenbereich frei. Am darauffolgenden zweiten Tag waren die Sphäroide dichter gepackt und wiesen nun durch ihre sphärische Form einen definierten Abschluss auf. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Sphäroide bis 10.000 Zellen einen optimalen Durchmesser von 350 bis 500 µm. Ab 20.000 Zellen wurde die kritische Größe schon überschritten; es traten erste Anzeichen zentraler Hypoxie auf (dunkle Stelle im Sphäroid-Inneren), insbesondere bei 40.000 Zellen. Ab Tag 3 wurden die Sphäroide noch runder und kompakter, ab 20.000 Zellen trat nun überall dunkle Stellen im Sphäroid auf, die auf einen hypoxischen Kern hindeuteten. Auffällig war, dass Sphäroide mit 40.000 und 60.000 Zellen einen vermeintlichen hypoxischen Kern aufwiesen, der fast das ganze Sphäroid einnahm. An Tag 4 veränderten sich die Sphäroide ab 20.000 Zellen deutlich. Sie wirkten weniger rund, bekamen eine ungleichmäßige Oberfläche und verloren Zellen an ihre Umgebung. Sie wiesen allgemein eine Auflösung ihrer typischen Architektur auf. Die kritische Größe von 500 µm hatten alle Sphäroide deutlich überschritten. 1000 Zellen zeigten immer noch keinen deutlichen Rand und waren ebenfalls nicht rund und eben. Sphäroide mit 40.000 Zellen hatten den größten Durchmesser, während die Sphäroide mit 60.000 Zellen deutlich kleiner waren, allerdings hatten sie deutliche Zellverluste an die Umgebung. Ab Tag 7 bis Tag 12 nahm die Qualität der Sphäroide deutlich ab und eine Reduzierung der strukturellen Integrität war bei allen Gruppen zu

beobachten. Die Sphäroide verloren deutlich ihr Kompaktivität und Architektur, sie wurden unrund und uneben. Sphäroide ab 5000 Zellen zeigten nun ebenfalls dunkle runde Veränderungen im Sphäroid-Inneren, die ab 20.000 Zellen das komplette Sphäroid einnahmen. Bei 40.000 Zellen nahmen die Zellaggregate außerhalb des Sphäroids deutlich zu. An Tag 12 verloren die größten Sphäroide ab 40.000 komplett ihre Kompaktivität, wurden instabil und konnten mit leichtem hoch und runter pipettieren des Mediums komplett in einzelne Zellen bzw. Zellaggregate aufgelöst werden. Für zukünftige Experimente mit der Zelllinie TY82 wird daher eine Ausgangszellzahl von 10.000 Zellen empfohlen. Die Tage 3 und 4 nach Sphäroidbildung scheinen hinsichtlich Morphologie und struktureller Integrität optimal für pharmakologische Versuche und Koinkubation geeignet.

Schaut man sich die Sphäroid-Generierung der Tumorzelllinie HepG2 an, zeigte sich ein komplett anderes Bild: Im Gegensatz zu TY82-Zellen waren die Zellen der HepG2-Zelllinie an Tag 1 wenig kompakt, eher lockere, homogene Zellaggregate. Sie schienen kreisrund zusammenzuliegen und konnten noch ohne Probleme mit einer Pipette vereinzelt werden. Am zweiten Tag zeigten die Sphäroide ein vergleichbares Erscheinungsbild, wirkten jedoch insgesamt kompakter und wiesen eine reduzierte Größe auf. Unabhängig von der Zellzahl traten bei allen Sphäroiden vereinzelt kleinere und größere strukturelle Löcher auf. Die Morphologie war insgesamt unregelmäßig, mit deutlichen Unebenheiten an der Oberfläche. An Tag 3 hatten sie die typische Sphäroidform erreicht, sie wirkten kompakt, die Oberfläche wirkte glatter, wenn auch noch teilweise etwas uneben. Man konnte nun deutlich die dunkle und typische Außenlinie erkennen. Sphäroide mit 1000 und 10.000 Zellen zeigten die deutlich rundeste, dichteste und glatteste Formation. Auch hier wurde die kritische Größe von 500µm ab 20.000 Zellen erreicht. Ab 40.000 Zellen wirkten die Sphäroide insgesamt deutlich kleiner, dunkler, zeigten einen helleren Kern und verloren deutlich Zellen an ihre äußere Umgebung. An Tag 4 waren die Sphäroide deutlich runder, die Außenlinie bis 20.000 Zellen deutlich und dunkel zu erkennen. Allerdings überstieg nun auch bei 10.000 Zellen das Sphäroid die kritische Größe von 500µm. Tag 6 und Tag 7 zeigten die Sphäroide bei einer Anzahl von 1000-20.000 Zellen eine sehr runde, typisch ausschauende, kompakte Formation. Keine Zellen schienen sich abgelöst zu haben. Allerdings kamen nun auch Sphäroide mit 5000 Anfangs-Zellzahlen an ihre kritische Größe von 500 µm nahe heran. Von Tag 8 bis Tag 10 wiesen die Sphäroide zwar die gleiche Größe auf, allerdings veränderten sie ihre Form: sie wurden „unrunder“ und dunkler. Hier schien nun die Grenze der funktionstüchtigen und gesunden Sphäroide erreicht zu sein. Auch die Zellen ab 40.000 sahen weiterhin nur sehr dunkel und klein aus, verloren immer mehr Zellen an ihre Umgebung. An Tag 13 waren die Sphäroide bis 20.000 Zellen strukturell intakt und verloren keine Zellen an ihre Umgebung. Sie schienen sich wenig seit Tag 8 verändert zu haben.

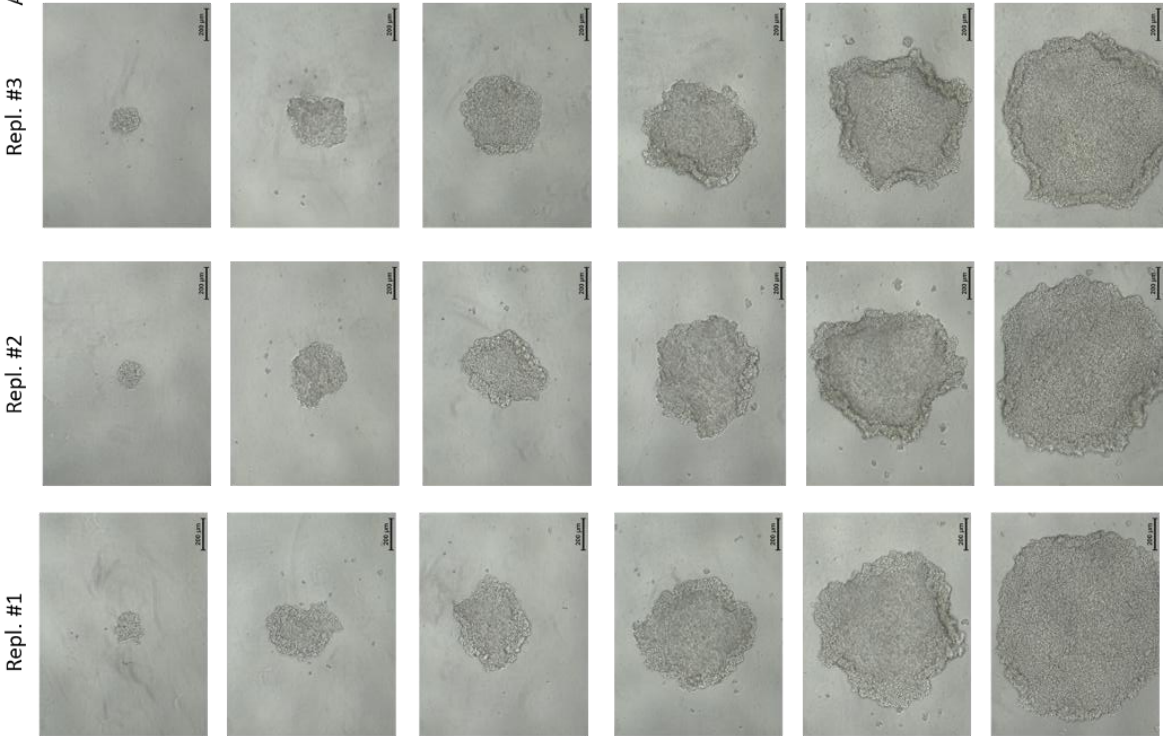
Für zukünftige Experimente mit HepG2-Sphäroiden wird daher eine Start-Zellzahl von 5.000 Zellen empfohlen, da sie die kritische Größe von 500 µm nicht überschritten und über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen eine stabile Morphologie aufwiesen.

TY82: Tag 2



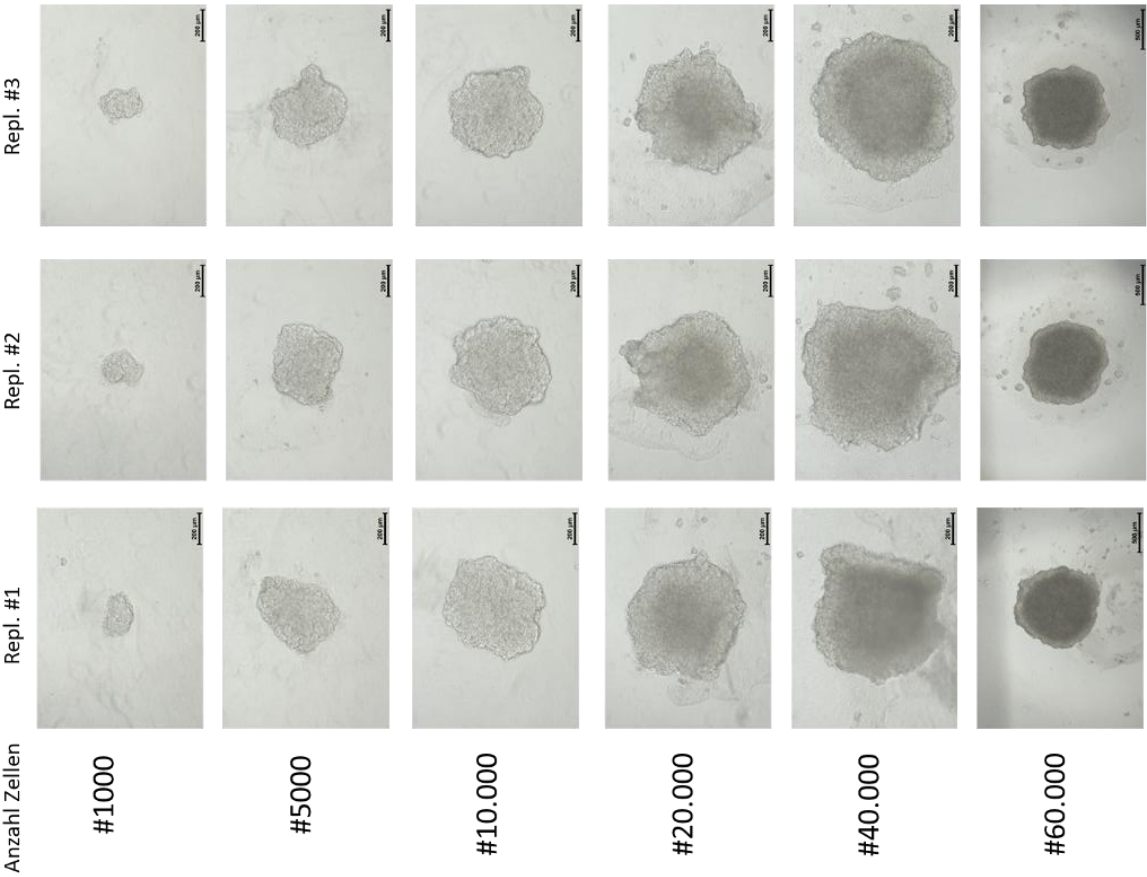
Anzahl Zellen	#1000	#5000	#10.000	#20.000	#40.000	#60.000
---------------	-------	-------	---------	---------	---------	---------

TY82: Tag 1

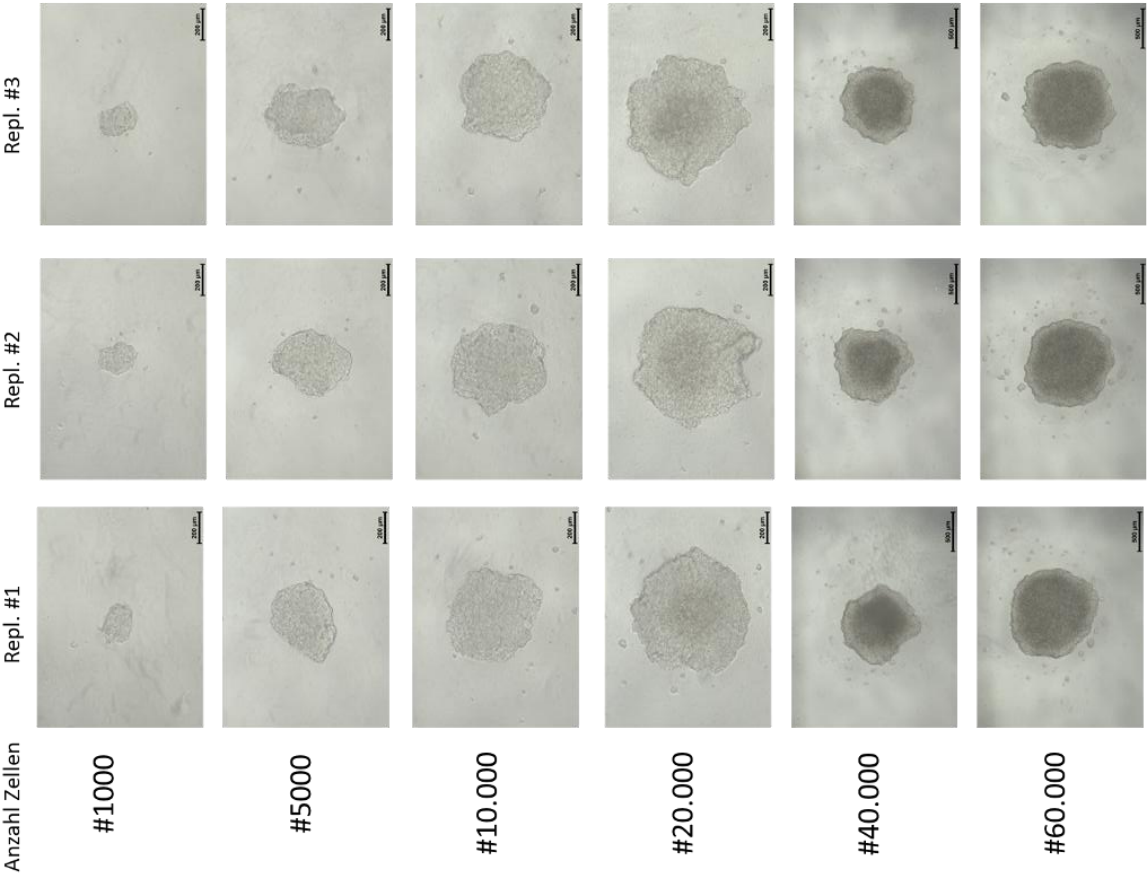


Anzahl Zellen	#1000	#5000	#10.000	#20.000	#40.000	#60.000
---------------	-------	-------	---------	---------	---------	---------

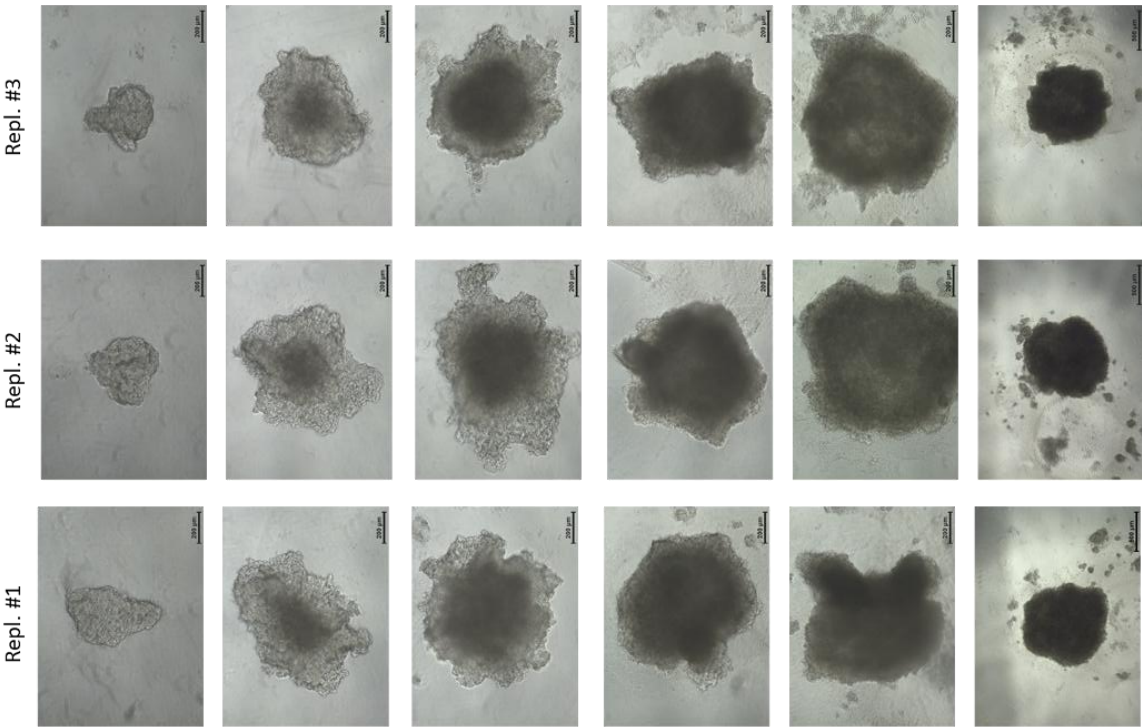
TY82: Tag 4



TY82: Tag 3



TY82: Tag 8



#1000

#5000

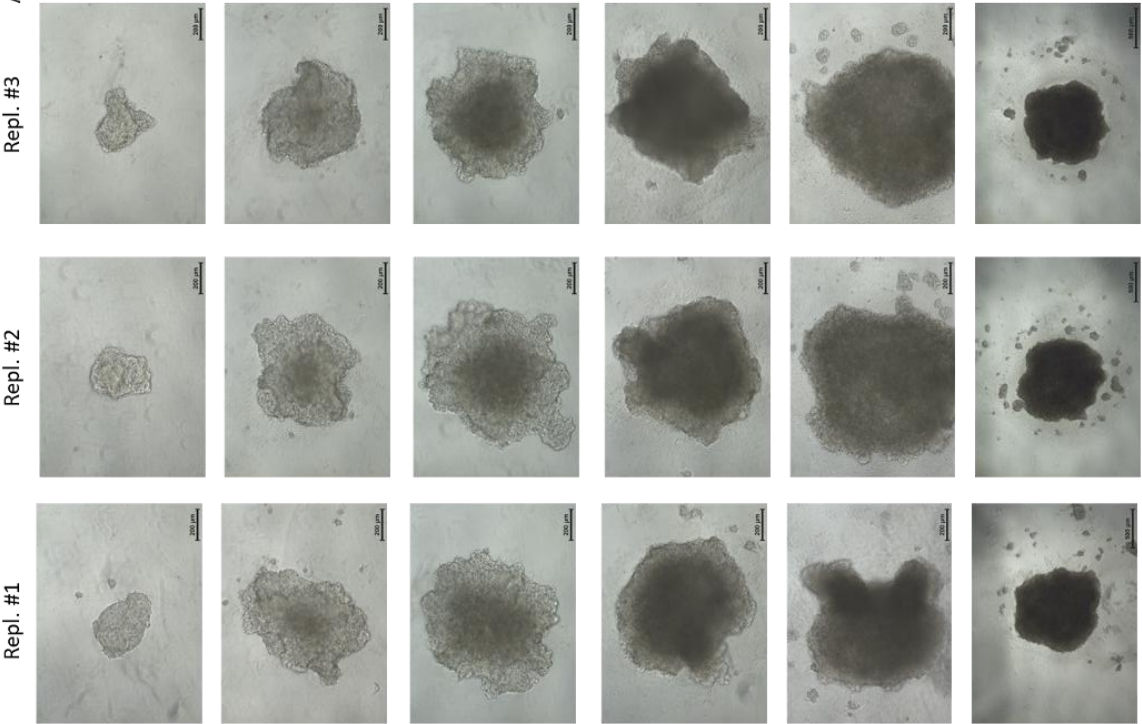
#10.000

#20.000

#40.000

#60.000

TY82: Tag 7



#1000

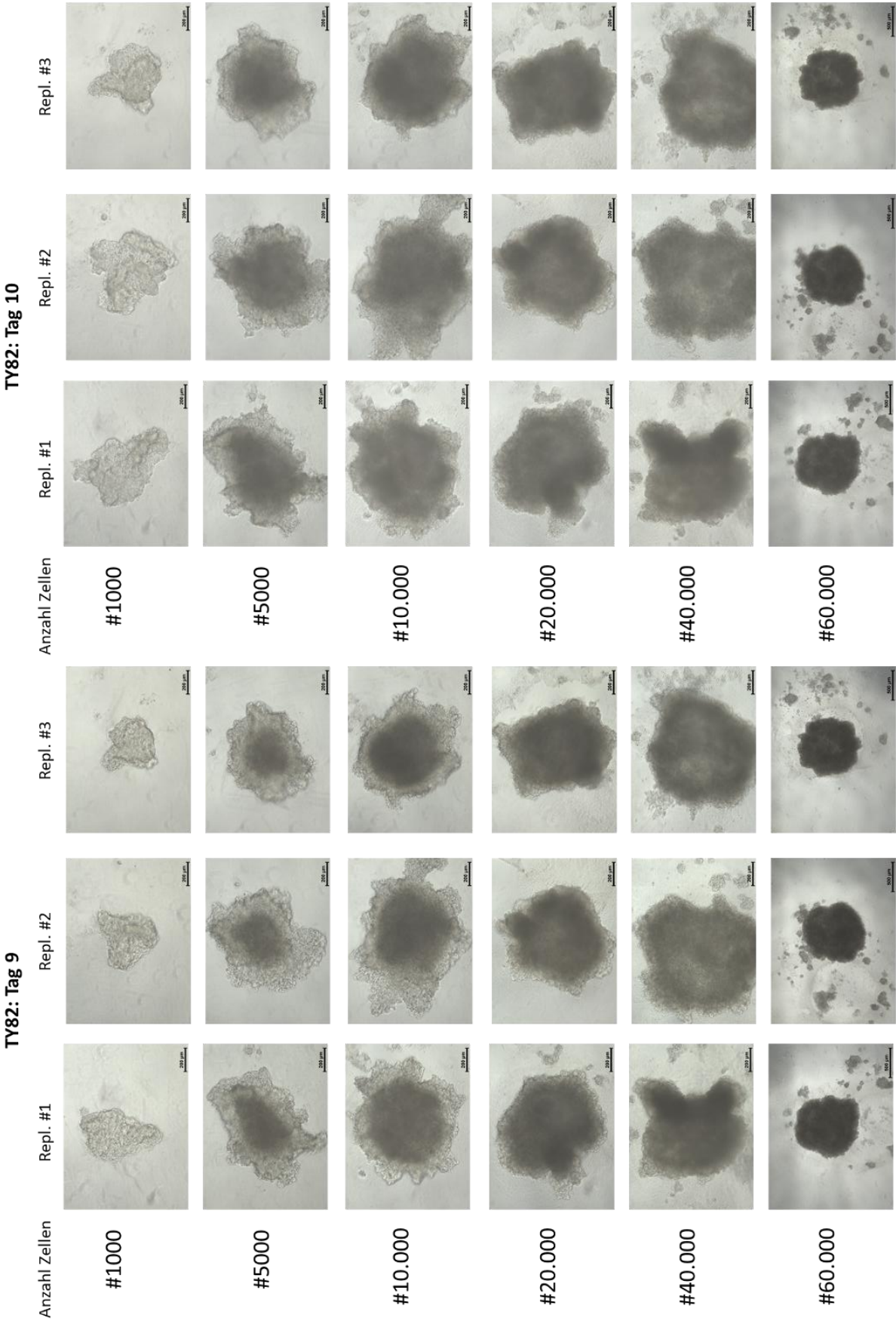
#5000

#10.000

#20.000

#40.000

#60.000



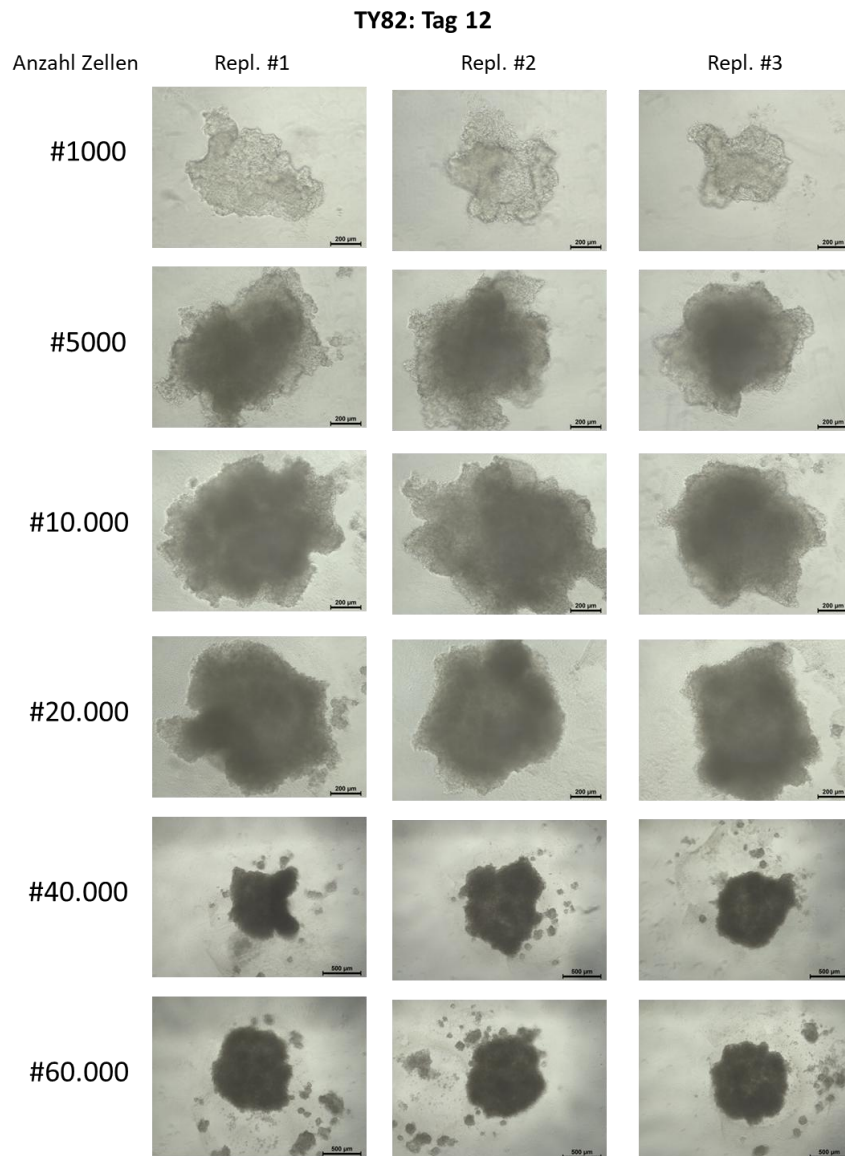
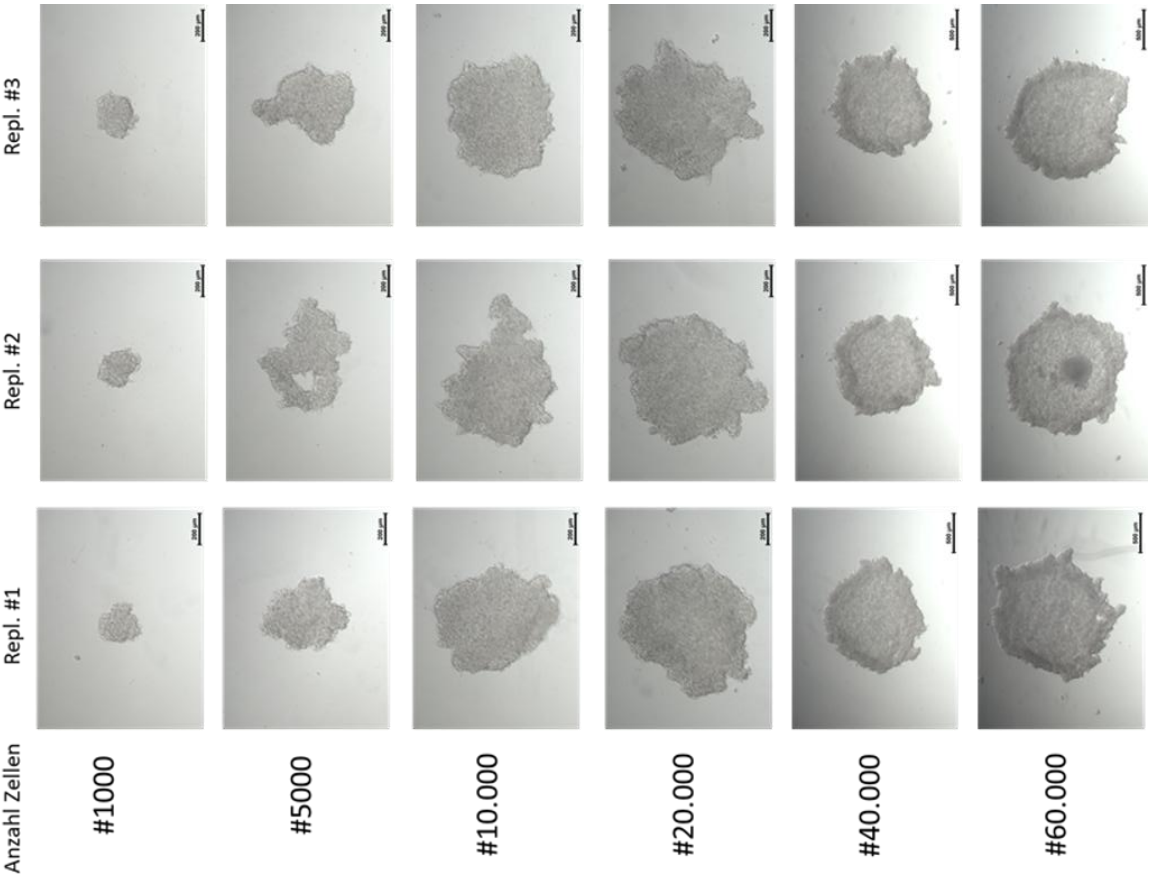
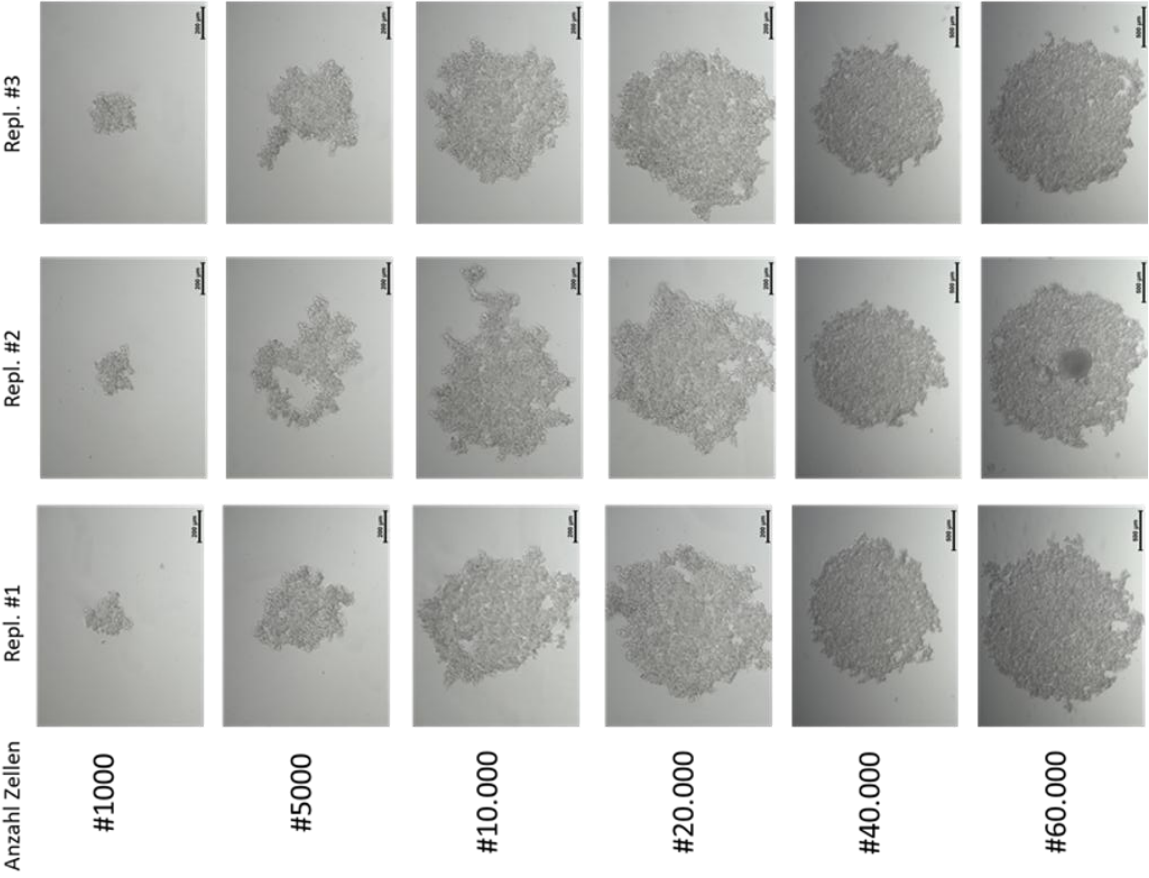


Abbildung 45: Übersicht der Morphologie von TY82-Sphäroiden über einen Zeitraum von 12 Tagen. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Sphäroiden, die aus unterschiedlichen Ausgangszellzahlen (1000, 5000, 10.000, 20.000, 40.000, 60.000 Zellen pro Sphäroid) generiert wurden, jeweils in dreifacher Ausführung. Die Entwicklung der Sphäroide wurden über einen Zeitraum von 12 Tagen dokumentiert, wobei Tag 1 dem ersten Tag nach der Aussaat der Zellen entspricht. Maßstab 200 μm .

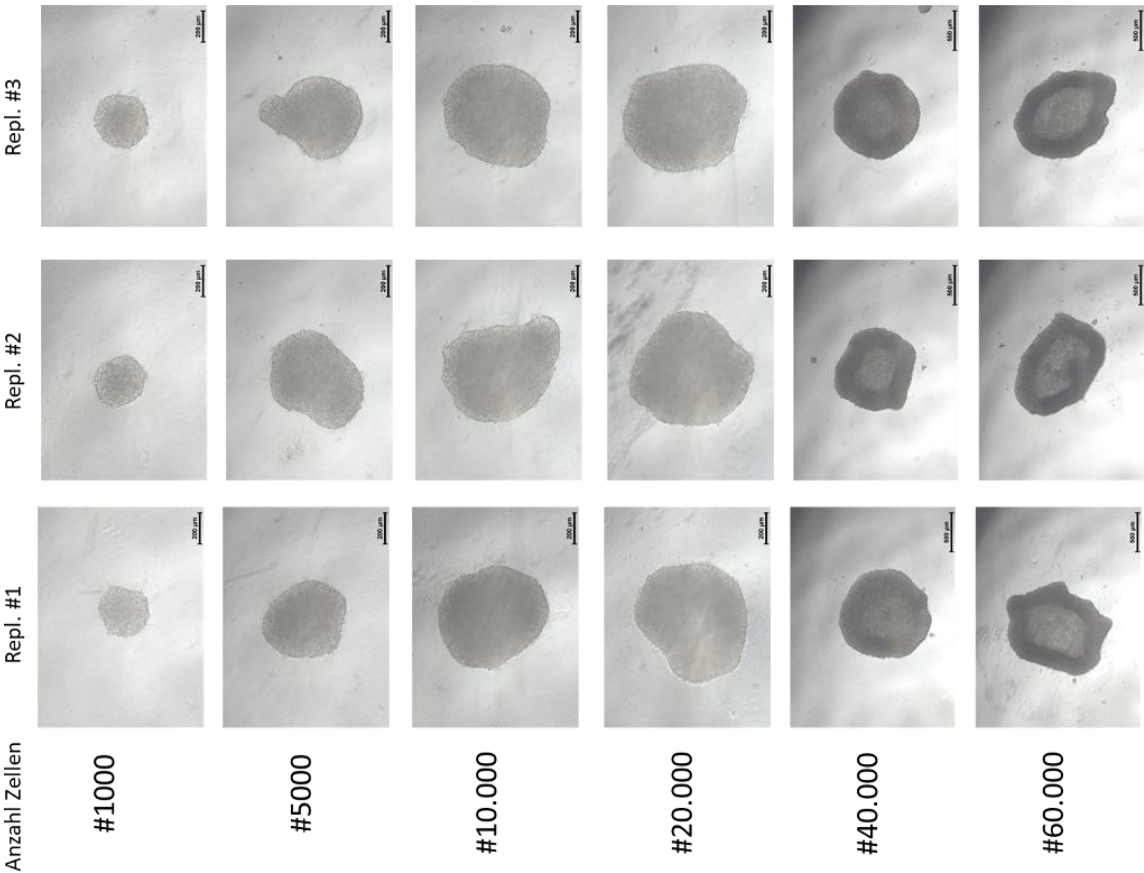
HepG2: Tag 2



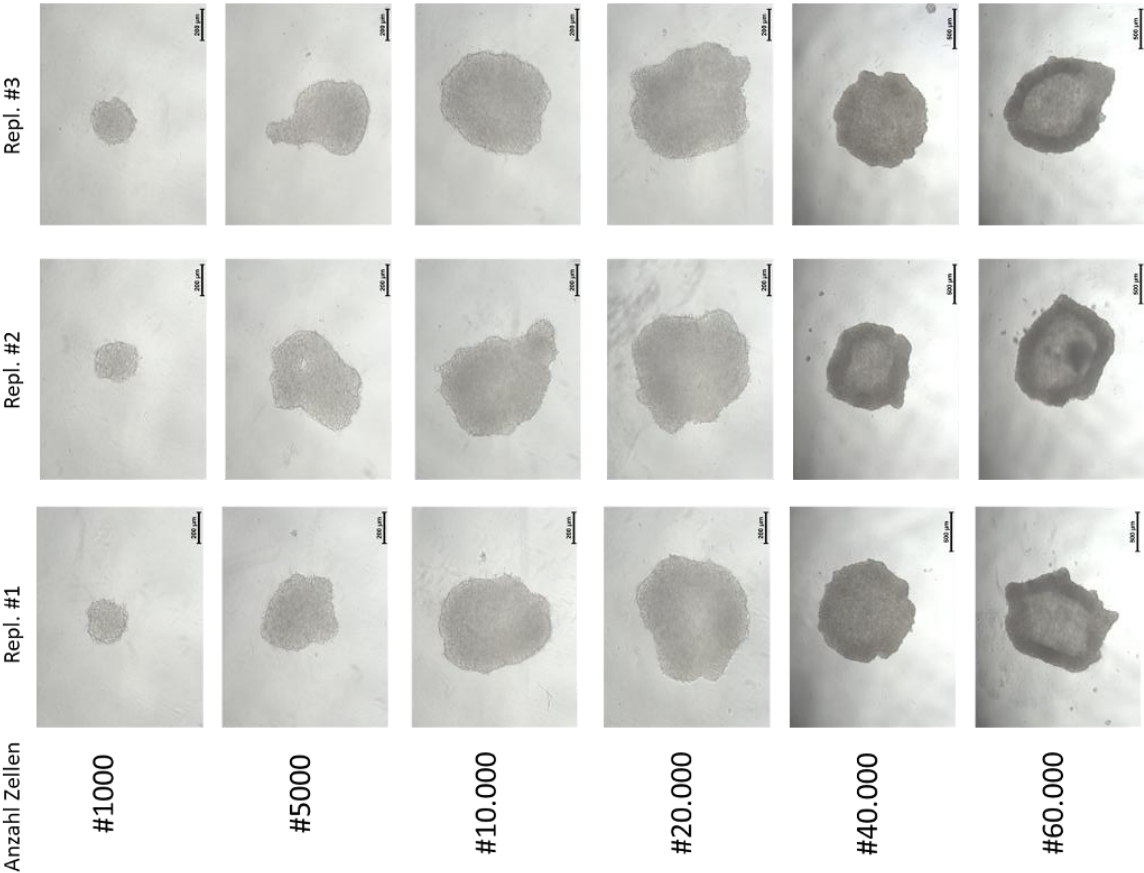
HepG2: Tag 1



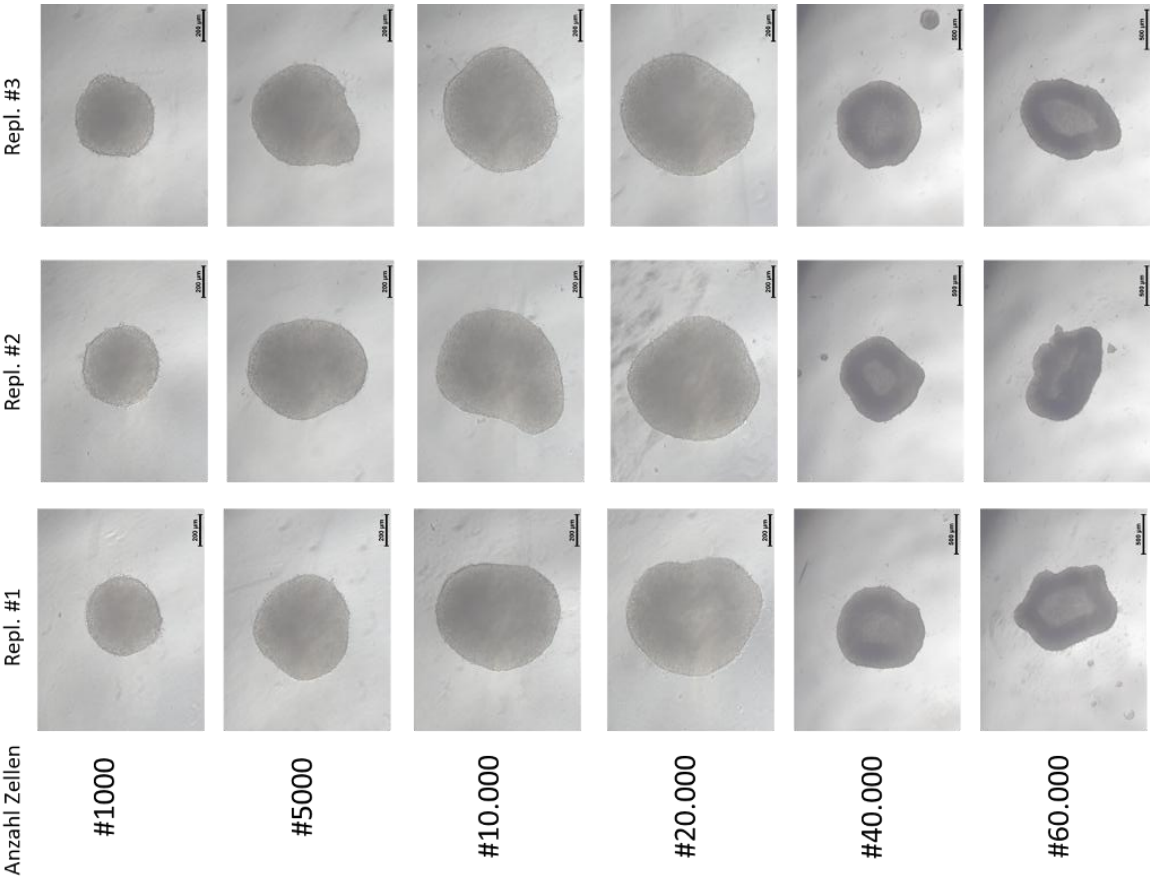
HepG2: Tag 4



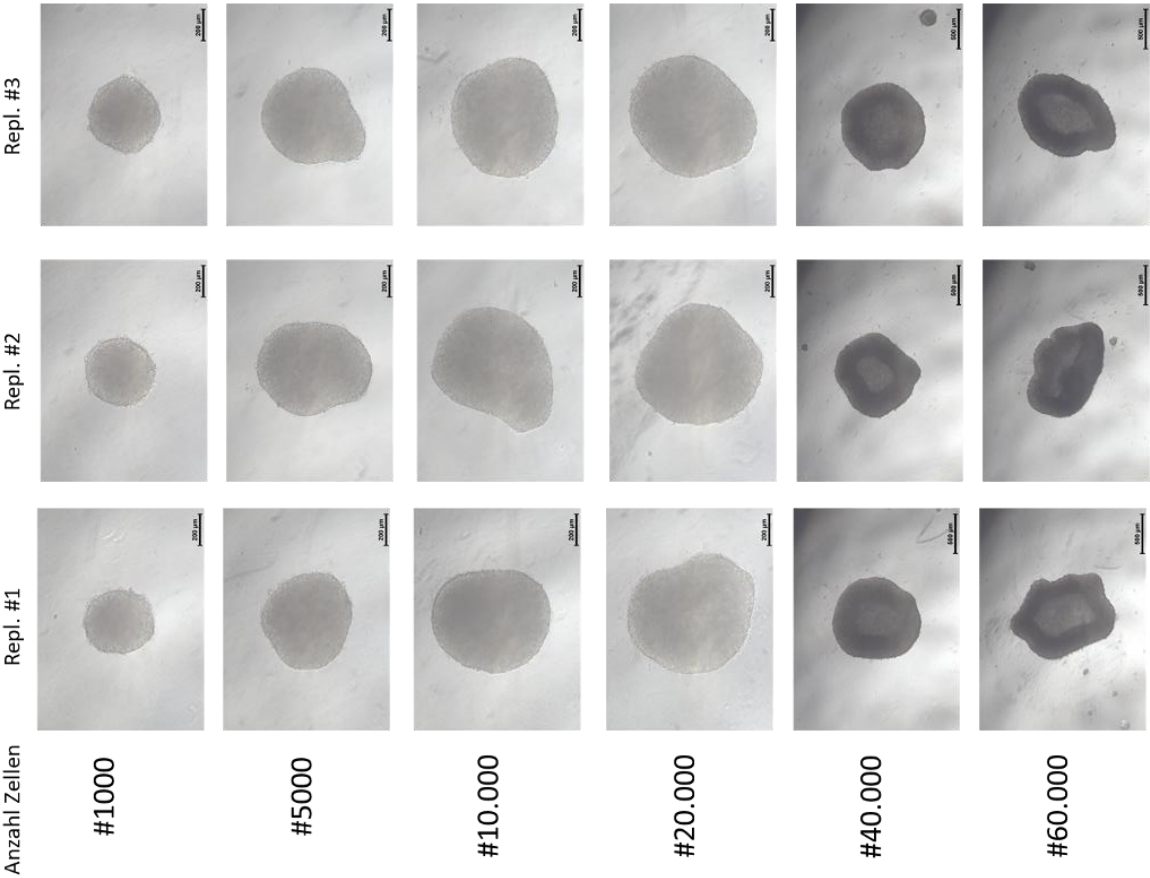
HepG2: Tag 3

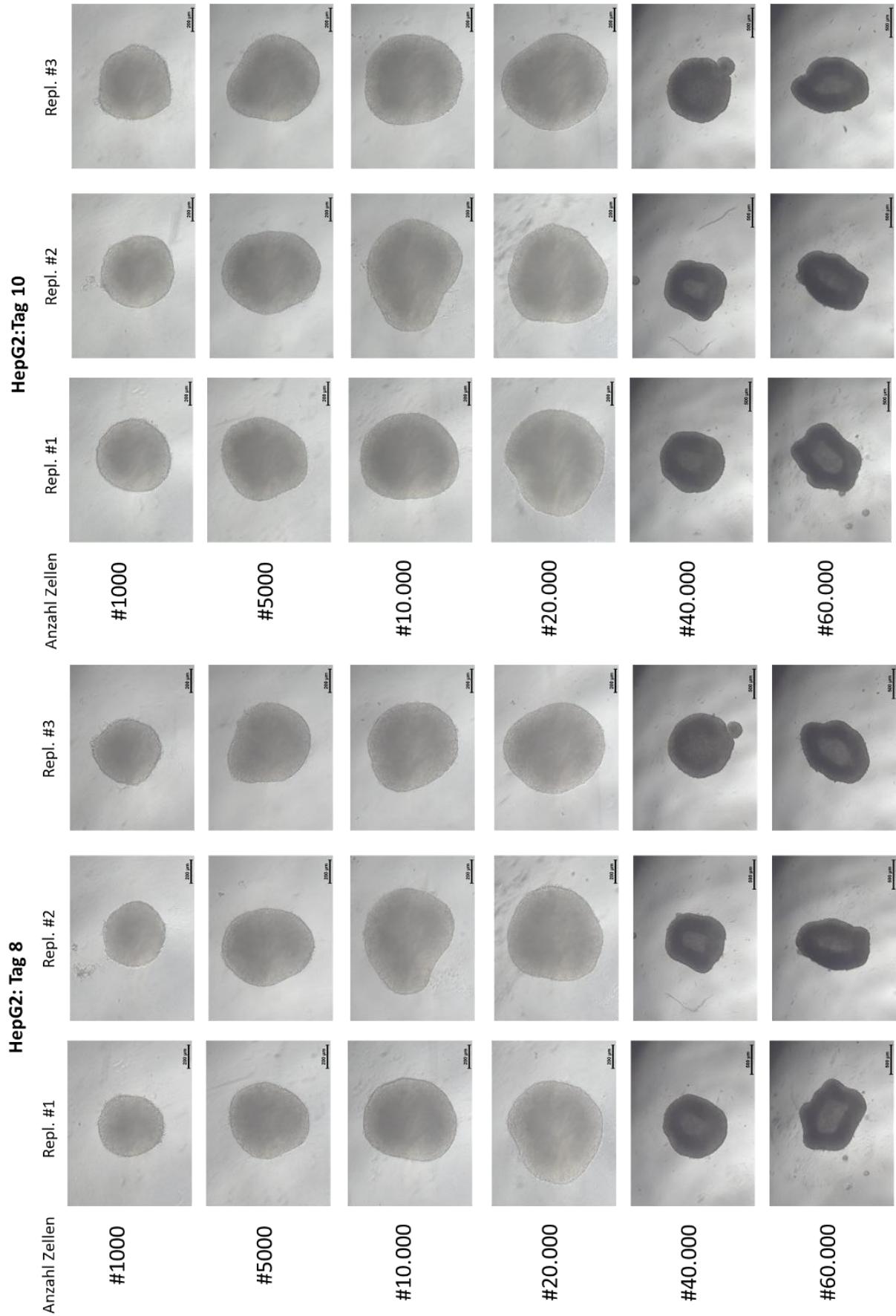


HepG2: Tag 7



HepG2: Tag 6





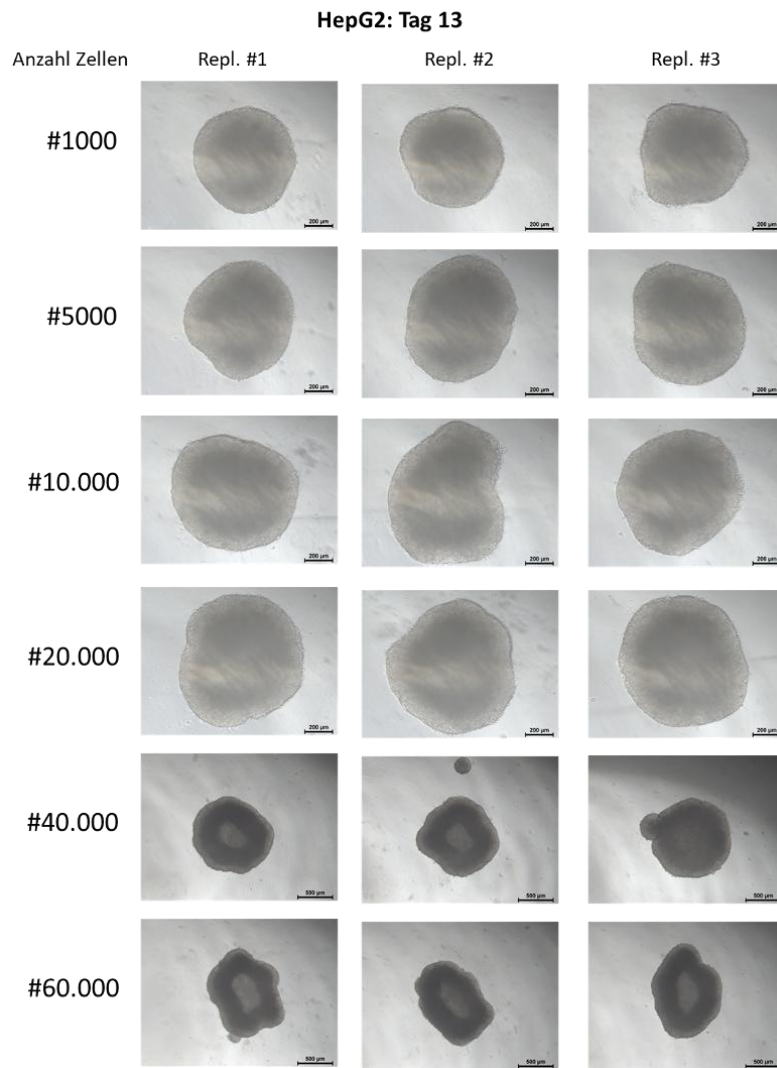


Abbildung 46: Übersicht der Morphologie von HepG2-Sphäroiden über einen Zeitraum von 13 Tagen. Gezeigt sind lichtmikroskopische Aufnahmen von Sphäroiden, die aus unterschiedlichen Ausgangszellzahlen (1000, 5000, 10.000, 20.000, 40.000, 60.000 Zellen pro Sphäroid) generiert wurden, jeweils in dreifacher Ausführung. Die Entwicklung der Sphäroide wurden über einen Zeitraum von 13 Tagen dokumentiert, wobei Tag 1 dem ersten Tag nach der Aussaat der Zellen entspricht. Maßstab 200 µm.

5 DISKUSSION

5.1 Analyse von Apoptose und Zytotoxizität durch NK-Zellen im 2D-Tumormodell

Natürliche Killerzellen sind Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, die gestresste Zellen, wie Tumorzellen und infizierte Körperzellen erkennen und ohne vorherige Sensibilisierung eliminieren können. Seit ihrer Entdeckung 1975 gelten sie als zentrale Komponente der Immunologischen Erstabwehr (Kiessling et al., 1975).

NK-Zellen üben ihre zytotoxische Funktion über verschiedene Mechanismen aus: Zum einen durch Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität. Hier erkennen NK-Zellen über den CD16-Rezeptor antikörperbedeckte Zielzellen und lysieren sie. Sie können aber auch Apoptose durch eine Bindung an FASL- oder Trail-Liganden auf Zielzellen induzieren oder vermitteln ihre Zytotoxizität durch Granula. Durch eine Freisetzung von Perforin und Granzymen wird der programmierte Zelltod ausgelöst. Sie gelten als erste Hürde gegen Pathogene und sind durch ihre schnelle Reaktionsfähigkeit sehr schnell aktiv (Brodin et al., 2009; Murphy et al., 2009; Vivier et al., 2008).

Angesichts der zentralen Rolle von NK-Zellen in der immunologischen Tumorabwehr war das Ziel dieser Arbeit, den Einfluss von NK-Zellen auf die Viabilität der Tumorzelllinien TY82 und HepG2 in einem Koinkubations-Modell zu untersuchen. Dabei sollte insbesondere das zytotoxische Potential der NK-Zellen, ihre Fähigkeit zur Induktion von Apoptose, sowie mögliche Veränderungen ihrer Aktivierungs- und Funktionsweise in Anwesenheit der Tumorzellen charakterisiert werden. Für die Koinkubation wurde ein hohes Verhältnis von 10:1 von NK-Zellen zu Tumorzellen gewählt, orientiert an der Methodik von *Lanuza et al.*, die einen direkten Vergleich zwischen niedriger (1:3) und hoher (1:9) Ratio vornahmen. In dieser Studie zeigte sich, dass eine hohe Effektorzellzahl mit einer signifikant gesteigerten Apoptoseinduktion in den Tumorzellen einhergeht (Lanuza et al., 2018). Zudem wurden die NK-Zellen vor und während der Koinkubation mit IL-15 präaktiviert. Das Priming erfolgte unmittelbar nach der Isolation durch eine Übernackultivierung und wurde am nächsten Tag während der Koinkubationsdauer fortgeführt. Vorangegangene Experimente in unserem Labor bestätigten die Wirksamkeit dieser Stimulation, indem sie deutlich erhöhte funktionelle Aktivität der NK-Zellen beobachteten. Diese Beobachtungen deckten sich mit den Ergebnissen von Boermann *et al.*, die nachwiesen, dass IL-15-aktivierte NK-Zellen gegenüber verschiedenen Rhabdomyosarkom-Zelllinien eine signifikant gesteigerte zytotoxische Effizienz aufwiesen, verglichen mit unbehandelten NK-Zellen (Boerman et al., 2015). Die durchgeführten Koinkubationsversuche in einem 2D-Kultursystem bestätigten deutlich, dass NK-Zellen in der Lage sind, eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung auf verschiedene Tumorzelllinien auszuüben. Beide untersuchten Zelllinien, TY82 und HepG2, zeigten nach der Koinkubation mit NK-Zellen eine signifikante Abnahme der Zellviabilität, verbunden mit einem Anstieg apoptotischer Zellanteile. Bemerkenswert ist vor allem die starke Reaktion der als therapieresistent geltenden TY82-Zellen. Bereits nach 48 Stunden Koinkubation sank

die Zellvitalität drastisch auf unter 10 %, begleitet von einem ausgeprägten Anstieg spät-apoptotischer Zellen. Dieser Effekt verstärkte sich über 96 Stunden weiter. Auch bei HepG2-Zellen war eine signifikante Reduktion der Zellviabilität sowie ein signifikanter Anstieg früh-apoptotischer Zellen nachweisbar, allerdings fiel die Reaktion insgesamt moderater aus. Die Vitalität sank nach 48 Stunden auf rund 45%, bei einem gleichzeitig starken Anstieg früh-apoptotischer Zellen. Der Anteil nekrotischer Zellen blieb bei beiden Zelllinien konstant niedrig, was auf eine primär apoptotische Wirkung der NK-Zellen hindeutet (Abbildung 19).

Morphologisch waren die Veränderungen frühzeitig sichtbar. Bereits nach zwei Stunden Koinkubation zeigten beide Tumorzelllinien unter dem Mikroskop eine abrupte Ablösung vom Plattenboden und eine deutliche Schrumpfung mit kugelförmiger Form (Abbildung 21). Dies deutet auf eine frühe und anhaltende Beeinflussung der Tumorzellen durch die Interaktion mit NK-Zellen, einen raschen zellulären Stressmechanismus und schnelle Einleitung des Zelltodes hin.

Die begleitenden Degranulationsanalysen (Abbildung 27) ergaben, dass die NK-Zellen in Anwesenheit von TY82-Zellen eine deutlich erhöhte CD107a-Expression bereits nach 4 Stunden aufwiesen. Dies deutet auf eine schnelle und effektive Aktivierung der zytotoxischen Funktion der NK-Zellen hin. Dieser Effekt war bei HepG2-Zellen nicht zu beobachten. Hier erhöhte sich die Degranulation der NK-Zellen auch nach 24 Stunden deutlich, allerdings ohne Signifikanz. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Interaktion zwischen NK-Zellen und unterschiedlichen Tumorzelllinien stark variieren kann und möglicherweise durch die Tumorbio-logie (z. B. Immunmodulation, Liganden-Expression) beeinflusst wird. Ergänzend dazu konnte bei den TY82-Zellen eine signifikant erhöhte GLUT-1-Expression bei den NK-Zellen nach 16 Stunden Koinkubation festgestellt werden. Diese erhöhte GLUT-1-Expression spricht für eine gesteigerte glykolytische Aktivität der NK-Zellen als Antwort auf die Tumorinteraktion. Für HepG2-Zellen war kein vergleichbarer Effekt nachweisbar (Abbildung 28). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die metabolische Umprogrammierung von NK-Zellen, vermutlich zur Unterstützung ihrer Effektorfunktion, in Abhängigkeit von der Zielzelllinie unterschiedlich stark ausfällt und sich dies unter anderem in einer variablen Expression des Glukosetransporters GLUT-1 widerspiegeln könnte.

Zur weiteren Beurteilung der Immunaktivität der NK-Zellen im Koinkubationsmodell wurde die IFN- γ -Sekretion als funktioneller Marker herangezogen. Bei der Analyse der IFN- γ -Produktion in den Überständen von Koinkubierten TY82- und HepG2-Zellen, fällt auf, dass diese in Koinkubation zwar erhöht, aber nicht signifikant gesteigert sind (Abbildung 40 und Abbildung 41). Erhöhte IFN- γ -Werte in der Koinkubation von Tumorzellen mit NK-Zellen weisen auf eine aktive Immunantwort der NK-Zellen hin (Boyington et al., 2001; Hörner et al., 2004). Bei den TY82-Zellen war ebenfalls in den Überständen der Koinkubation eine signifikante Erhöhung für Granzyme A und Granzyme B, Perforin und GM-CSF zu erkennen. HepG2 zeigte signifikante Erhöhungen in IL-13, IL-10, Granzyme A und Granzyme B, sowie GM-CSF. Diese Ergebnisse legen die Aktivierung zellulärer Zytotoxizitätsmechanismen von NK-Zellen

bei der Koinkubation nahe. Insgesamt verdeutlichen diese Daten, dass die NK-Zell-Koinkubation einen deutlichen immunaktivierenden Effekt besitzt, insbesondere hinsichtlich der Effektormoleküle, was die Bedeutung von NK-Zellen im Kontext tumorimmunologischer Therapien hervorhebt. In dieser Arbeit wurden drei zentrale Parameter zur Bewertung der Funktionalität von NK-Zellen herangezogen: die Degranulation anhand der CD107a-Expression (Alter et al., 2004), die Produktion von IFN- γ als funktioneller Marker der Immunantwort und die direkte Messung der Zytotoxizität an den Tumorzellen (Claus et al., 2009; Tognarelli et al., 2016).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass eine Koinkubation zu einer signifikanten Abnahme der Tumorzellviabilität führte, vor allem durch die Induktion apoptotischer Prozesse. Bei den HepG2-Zellen konnte eine starke zytotoxische Wirkung der NK-Zellen bereits in der frühen Interaktionsphase beobachtet werden, was durch eine rasche Aktivierung und einer gesteigerten GLUT-1-Expression bestätigt wurde. Die geringere Degranulation, wie sie bei HepG2 beobachtet wurde, könnte, in Anlehnung an Peroumal *et al.* (2016), auf eine reduzierte zytotoxische Aktivität und aktivierungsinduzierten Zelltodresistenz der NK-Zellen hindeuten (Peroumal et al., 2016). Der Vergleich beider Tumorzelllinien zeigt, dass die Effektivität NK-Zell-basierter Therapien stark von patienten- bzw. tumorspezifischen Eigenschaften abhängt, was für eine individualisierte Behandlungsstrategie spricht. Die Ergebnisse verdeutlichen jedoch auch das therapeutische Potential von NK-Zellen als eine vielversprechende immuntherapeutische Option, insbesondere im Kontext schwer behandelbarer solider Tumorformen wie dem Thymuskarzinom TY82. Angesichts der Tatsache, dass Immuntherapien bislang vor allem bei hämatologischen Neoplasien Erfolge verzeichnen, während ihre Wirksamkeit bei soliden Tumoren als limitiert gilt, kommt diesen Befunden besondere Bedeutung zu (Lamb et al., 2021; Morvan and Lanier, 2016).

5.2 Chemotherapeutische Behandlung und ihr Einfluss auf die Interaktion zwischen NK- und Tumorzellen in Koinkubation

Jewett *et al.* stellte 2014 fest, dass das Stadium der Zelldifferenzierung von Tumorzellen invers mit der Anfälligkeit gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität korreliert. Schlecht differenzierte Zellen sind dabei signifikant anfälliger für NK-Zellen, während gut differenzierte Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber chemotherapie-induziertem Zelltod zeigen (Jewett et al., 2014). Auf Grundlage dieser Erkenntnisse schlugen Kozłowska *et al.* einen dualen Ansatz vor, bei dem Chemotherapien, die gut differenzierte Zellen bevorzugen, mit Immuntherapien kombiniert werden, die gezielt schlecht differenzierte Tumorzellen eliminieren (Kozłowska et al., 2017; Lowry and Zehring, 2017).

In Anbetracht dieser Ansätze war es das Ziel dieser Versuchsreihe zu klären, ob eine Vorbehandlung von Tumorzellen mit Chemotherapeutika die Effektivität der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität steigern und somit einen synergistischen Effekt erzielen kann. Trotz einer deutlichen Induktion apoptotischer Prozesse durch NK-Zellen in der Koinkubation ließ sich ein solcher Synergismus weder bei der Apoptose, noch bei der Zytotoxizitätsmessung zuverlässig nachweisen. Die Anwendung des ApoTox-Glo™ Triplex Assays erlaubte eine präzisere Analyse der apoptotischen Prozesse, insbesondere durch Messung der Caspase-3/7-Aktivität. Dabei konnte für die Tumorzelllinie TY82 ein stark signifikant erhöhter Caspase-Aktivitätswert und Zytotoxizitätswerte nach nur 4 Stunden Koinkubation mit NK-Zellen beobachtet werden (Abbildung 31). Dies ist ein klarer Hinweis auf die Effektivität der NK-Zellen in der Induktion programmierter Zelltodmechanismen. Interessanterweise zeigte die parallele Behandlung mit dem Chemotherapeutikum Etoposid zwar ebenfalls eine starke Apoptoseinduktion, führte jedoch in Kombination mit NK-Zellen nicht zu einer Verstärkung dieses Effekts, sondern erreichte fast identische Werte. Bei diesem Versuch wurde als Kontrollzelllinie, die Leukämiezelllinie K-562 als Zielzelllinie eingesetzt, da sie aufgrund mangelnder MHC-I- und MHC-II-Expression als NK-Zell-sensitiv gilt (Lozzio and Lozzio, 1975). Sie zeigte ebenfalls nach 4-stündiger Koinkubation stark signifikant erhöhte Caspase-Aktivitätswert und Zytotoxizitätswerte und bestätigte ebenfalls die Effektivität der NK-Zellen in der Induktion zellulärer Selbstzerstörungsprozesse.

Um zu prüfen, ob eine verlängerte Vorbehandlungsdauer mit den Chemotherapeutika möglicherweise doch einen synergistischen Effekt erzielt, wurde der zuvor beschriebene Versuch erneut durchgeführt. Dabei erfolgte die Chemotherapie-Vorbehandlung über einen verlängerten Zeitraum von 48 Stunden, gefolgt von einer 24-stündigen Koinkubation mit NK-Zellen. Zusätzlich wurde die Tumorzelllinie HepG2 in die Analyse einbezogen. Da in der klinischen Behandlung von Thymuskarzinomen häufig eine Kombinationstherapie mit Etoposid und Cisplatin eingesetzt wird (Giaccone et al., 1996; Loehrer et al., 1994), entschieden wir uns zudem, auch Cisplatin im Hinblick auf seine Wirkung auf die Apoptose zu untersuchen. Die zusätzliche Vorbehandlung mit Etoposid oder Cisplatin über 48 Stunden konnte ebenfalls keinen synergistischen Effekt von Chemotherapie und Kokultur mit NK-Zellen erzielen. Allerdings stieg die Caspase 3/7-Aktivität in TY82-Zellen signifikant bei Zellen an, die mit Etoposid behandelt wurden im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Cisplatin konnte diesen Effekt nicht erreichen. Auffällig war insbesondere, dass eine verlängerte Vorbehandlung mit Etoposid im Vergleich zu den unbehandelten oder mit Cisplatin behandelten Zellen zu einer reduzierten NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität während der Koinkubation führte. Dies war ein Effekt, der sich konsistent in beiden getesteten Tumorzelllinien, TY82 und HepG2, zeigte (Abbildung 32). Frühere Studien belegen, dass Substanzen wie Etoposid DNA-Schäden in Tumorzellen verursachen und eine MYC-Überexpression induzieren, die wiederum die Aktivierung von NK-Zellen hemmt (Linstra et al., 2025). Dies könnte darauf hindeuten, dass Chemotherapie zelluläre Stressantworten in Tumorzellen unterdrückt und damit die Empfindlichkeit gegenüber NK-Zellen verringern.

Auch die durchflusszytometrische Analyse der Apoptosemarker AnnexinV/ 7-AAD bestätigte die Ergebnisse der vorherigen Experimente. Cisplatin und Etoposid beeinträchtigen die Zytotoxizität der NK-Zellen in Koinkubation nicht und führen zu keinem synergistischen Effekt (Abbildung 38).

Morphologisch konnten bereits nach kurzer Koinkubationszeit mit NK-Zellen typische Anzeichen einer Zellschädigung bei den Tumorzellen beobachtet werden (Abbildung 33). Dies war ein Phänomen, das unabhängig von der Vorbehandlung mit Etoposid auftrat. Das untermauert, dass NK-Zellen bereits innerhalb weniger Stunden eine effektive zytotoxische Wirkung entfalten können, ohne dass eine zusätzliche Chemotherapieunterstützung notwendig wäre. In Anlehnung an *Kozłowska et al.* und *Lowry and Zehring et al.* wäre ein weiterer potenzieller Ansatz, um einen synergistischen Effekt zu erzielen, die Umkehrung der bisherigen Vorgehensweise, indem in zukünftigen Experimenten zunächst die NK-Zellen mit den Tumorzellen koinkubiert und erst danach die Chemotherapie angewendet wird (*Kozłowska et al.*, 2017; *Lowry and Zehring*, 2017).

Zusammenfassend deuten die vorliegenden Daten darauf hin, dass NK-Zellen, insbesondere gegenüber der TY82-Zelllinie, eine ausgeprägte zytotoxische Wirkung entfalten können. Der Zusatz von Chemotherapeutika wie Etoposid oder Cisplatin zeigte keine synergistische Wirkung und schien sogar kontraproduktiv, da eine Reduktion der NK-Zell-vermittelten Effekte beobachtet wurde. Dies weist darauf hin, dass eine kombinierte Therapie sorgfältig hinsichtlich Dosierung, zeitlichem Ablauf und Wirkmechanismen überprüft werden muss, um potenzielle negative Wechselwirkungen zu vermeiden.

5.3 Interaktion zwischen Parthanatos und Immunantwort: Die Rolle von Olaparib in der Tumor- und NK-Zell-Koinkubation

Parthanatos ist eine Form des programmierten Zelltods, die durch eine Überaktivierung des Enzyms PARP-1 ausgelöst wird. Große DNA-Schäden aktivieren übermäßig die PARP-1, was zu einer Akkumulation von Poly-ADP-Ribose (PAR)-Polymeren führt. Diese induzieren die Translokation von AIF aus den Mitochondrien in den Zellkern, wo AIF mit MIF eine weitreichende DNA-Fragmentierung und den Zelltod auslöst. Dies läuft ohne Beteiligung von Caspasen ab.

Ziel dieser Versuche war es, die Rolle von Parthanatos in der Induktion von Zelltodmechanismen in Tumorzellen, insbesondere im Zusammenspiel mit NK-Zellen, zu untersuchen. Hintergrund war, dass in den vorangegangenen Versuchen bereits nach zweistündiger Koinkubation morphologische Zellveränderungen unter dem Mikroskop sichtbar waren, lange bevor apoptotische Marker deutlich wurden. Diese frühe Reaktion sprach dafür, dass neben Apoptose auch andere Formen des Zelltodes

beteiligt sein könnten. Aufgrund fehlender Parthanatos-Marker auf dem Markt entschieden wir uns für den PARP-Inhibitor Olaparib. Die hier zugrundeliegende Hypothese war es, dass Olaparib nicht nur selbst zytotoxisch auf die Tumorzellen wirkt, sondern möglicherweise synergistische Effekte in der Koinkubation mit NK-Zellen bewirkt. Die durchgeführten Tumorzell-Wachstumsanalysen zeigten deutlich, dass die Tumorzelllinie TY82 wesentlich sensitiver auf Olaparib reagierte als die HepG2-Zellen (Abbildung 34). Bereits 2,5 μM Olaparib führten bei den TY82-Zellen zu einer deutlichen Reduzierung der Zellviabilität, während HepG2-Zellen weitgehend resistent blieben. Diese Unterschiede könnten auf variierende Expressionen von DNA-Reparaturenzymen wie PARP1 oder unterschiedliche genetische Hintergründe (z. B. p53-Mutationen) zurückzuführen sein. Die Entscheidung, 5 μM Olaparib für weiterführende Experimente zu verwenden, war methodisch gerechtfertigt, da diese Konzentration eine Wirkung auf die empfindliche Zelllinie zeigte, ohne die resistente Linie vollständig zu eliminieren. Die Tatsache, dass eine Behandlung mit Olaparib bei den TY82-Zellen bereits zu einem Anstieg toter Zellen führte, deutet auf eine mögliche Beteiligung des Parthanatos-Weges hin.

In den Zytotoxizitätsversuchen mit einer Olaparib-Vorbehandlung der Tumorzellen, war zu beobachten, dass Olaparib keine synergistische Wirkung auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität hatte. Die Tumorzellen wiesen eine vergleichbare Reduzierung der Viabilität und der apoptotischen Werte wie in der unbehandelten Kontrolle auf (Abbildung 36 und Abbildung 38). Auch in den Degranulationsanalysen konnte kein Einfluss einer Vorbehandlung mit Olaparib auf die CD107a-Expression von NK-Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 37). Weder bei den TY82-Zellen noch bei den HepG2-Zellen konnte eine Steigerung CD107a-Expression der NK-Zellen beobachtet werden. Dies widerlegt unsere These, dass Olaparib die Tumorzellen schwächt und so die NK-Zellen leichter in die Lage versetzt, deren Viabilität leichter zu beeinträchtigen.

Zur Untersuchung der immunmodulatorischen Effekte der PARP-Inhibition durch Olaparib in Kombination mit einer NK-Zell-Koinkubation führten wir eine Quantifizierung verschiedener Proteine wie Zytokine und Effektormoleküle aus Überständen von Koinkubations-Experimenten durch (Abbildung 40 und Abbildung 41). In der Zelllinie TY82 führte eine 24-stündigen Vorbehandlung mit Olaparib und anschließender Koinkubation zu einer signifikanten Erhöhung der Effektormoleküle Granzyme B. Bei TY82-Zellen traten keine weiteren signifikanten Erhöhungen nach einer Olaparib-Behandlung auf, was dafür spricht, dass Olaparib hier vorwiegend zytotoxische Immunantworten unterstützt, ohne das Zytokinmilieu wesentlich zu modulieren. Im Gegensatz dazu kam es bei HepG2-Zellen nach der Behandlung mit dem Chemotherapeutikum und anschließender NK-Zell-Koinkubation zu signifikanten Erhöhungen in den proinflammatorischen Zytokinen GM-CSF und IL-5 und den anti-inflammatorischen Zytokinen IL4, IL-10 und IFN- γ . Diese Ergebnisse legen nahe, dass Olaparib in HepG2-Zellen nicht nur eine Immunaktivierung durch Zytotoxizität (über NK-Zellen) unterstützt, sondern auch direkte Effekte auf das Zytokinprofil tumorzellautonom ausübt. Die beobachtete Zunahme von IFN- γ bei Olaparib-

behandelten und koinkubierten HepG2-Zellen untermauert zusätzlich eine gesteigerte Immunaktivität, insbesondere im Sinne einer proinflammatorischen Immunantwort, denn NK-Zellen produzieren Interferon- γ (IFN- γ), was zu einer verstärkten Aktivierung von Makrophagen beitragen kann (Hörner et al., 2004). Allerdings ist zu beachten, dass es inzwischen Hinweise darauf gibt, dass IFN- γ auch andere, kontraproduktive Wirkungen haben kann: Studien zeigen, dass IFN- γ über die JAK/STAT1-Signalkaskade die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf Tumorzellen erhöht (Zhou, 2009). Da IFN- γ selbst von NK-Zellen sezerniert wird, trägt es somit direkt zur Hochregulation der MHCI-Expression bei (Gidlund et al., 1978). Auch *Cho et al.* konnten in einem Melanom-Mausmodell nachweisen, dass die Verabreichung von IFN- γ zu einer deutlichen Steigerung der MHCI-Expression auf Tumorzellen führt (Cho et al., 2011). Dies würde dazu führen, dass NK-Zellen nicht so zytotoxisch gegen die Tumorzellen wirken können. Unsere Experimente weisen ebenfalls darauf hin: HepG2-Zellen sezernieren nach Olaparib-Behandlung und Koinkubation vermehrt IFN- γ und zeigen gleichzeitig eine verminderte apoptotische Zytotoxizität. Die durch Olaparib induzierten Effekte waren Zelllinien-abhängig und deuten auf eine mögliche Selektivität der PARP-Inhibition im immunmodulatorischen Kontext hin. Die unterschiedlichen Reaktionen der Zelllinien könnten durch variierende intrinsische Mutationen, Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität oder auch durch das epigenetische Profil bedingt sein. Festzuhalten ist, dass die Erhöhungen unter Olaparib sich bei beiden Zelllinien auf einem ähnlichen Niveau wie die unbehandelte Kontrolle befindet und kein synergistischer Effekt zu erkennen ist. Im Gegensatz zu den Granzymen stieg Perforin zwar in beiden Zelllinien an, konnte aber keine Signifikanz erreichen. Dies könnte auf eine Verzögerung oder zu kurze Koinkubationszeit hinweisen. Die Wirkung von GM-CSF als immun-stimulatorisches Zytokin war in beiden Zelllinien nach der Koinkubation bei behandelten und unbehandelten Zellen vorhanden, wenn auch nicht immer signifikant erhöht. Dies bestätigt, dass dieser Faktor eine wichtige Aufgabe bei der Interaktion zwischen Tumorzellen und NK-Zellen einnimmt. Die fehlende Veränderung des MIF-Spiegels, unabhängig von Behandlung oder Koinkubation, muss das Modell Parthanatos in diesem Modell als Ursache für den beobachteten Zelluntergang noch untersucht werden. In weiterführenden Experimenten könnten die nukleären Konzentrationen von PARP-1 oder PAR durch gezielte Färbung visualisiert und mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert werden. Ergänzend dazu wären Western-Blot-Analysen sowie Proteinquantifizierungen geeignete Methoden, um die Expression und Aktivierung dieser Zellmoleküle genauer zu untersuchen und Parthanatos effektiver nachzuweisen.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse das immunaktivierende Potenzial der NK-Zell-Koinkubation sowie ergänzende, teilweise selektive Wirkungen von Olaparib im Hinblick auf eine Immunaktivierung. Möglicherweise könnten Experimente mit verlängerten Zeitverläufen weitere Effekte zeigen, da in den Wachstumskurven ab 48 Stunden ein deutlicher Zelluntergang unter Olaparib zu beobachten war. Ob dabei der Zelltodmechanismus Parthanatos eine Rolle spielt, lässt sich anhand der

vorliegenden Daten nicht klären. Zur Beantwortung dieser Frage wären weitere Versuche erforderlich.

5.4 Immunmodulation und Zellstress unter Low-Glucose-Bedingungen: Einfluss auf die Tumorzellen und NK-Zell-Aktivität

Tumorzellen zeigen einen stark erhöhten Glukosebedarf und nutzen vorwiegend die Glykolyse zur Energiegewinnung, selbst bei ausreichender Sauerstoffversorgung (aerobe Glykolyse). Dies wird als Warburg-Effekt in der Literatur beschrieben. Trotz der niedrigen ATP-Ausbeute bietet dieser Stoffwechselweg Tumoren Vorteile wie schnelle Energiegewinnung und Anpassung an ein sauerstoffarmes Milieu. Dabei sind Gene der Glykolyse und Glukosetransporter in Tumoren häufig überexprimiert (Altenberg and Greulich, 2004; Mueckler et al., 1985; Yamamoto et al., 1990). Eine reduzierte Glukoseverfügbarkeit ist dafür bekannt, die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika zu erhöhen (Cantuaria et al., 2001). Dies wurde auch in verschiedenen Studien mit Chemotherapeutikum Cisplatin festgestellt (Wang et al., 2013).

Ziel dieser Versuchsreihe war es, durch eine reduzierte Glukosekonzentration im Kulturmedium die Empfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber der Koinkubation mit NK-Zellen im Rahmen der Zytotoxizitätstests zu steigern. Es ist zu berücksichtigen, dass die in diesen *In vitro*-Versuchen eingesetzte Low Glucose-Konzentration von 1 g/L dem physiologischen Normoglykämiebereich im menschlichen Körper entspricht, während die als „High-Glucose“ bezeichnete Bedingung eine Glukosekonzentration aufweist, die vergleichbar mit einer hyperglykämischen Stoffwechsellage ist (Li et al., 2023; Pallas et al., 2023). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Kultur von TY82-Zellen in einem Low-Glucose-Medium (1 g/L) über mehrere Passagen hinweg nicht zu einer erhöhten Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der NK-Zellen führt im Vergleich zu TY82-Zellen in Standard-Medium (Abbildung 24). Es ist kein synergistischer Effekt nach der Koinkubation zu beobachten. In Low-Glucose-Medium kam es nach 48-stündiger Koinkubation mit NK-Zellen sogar zu einer Verminderung spät-apoptotischer und einer leichten Steigerung der früh-apoptotischen Werte im Vergleich zu den Zellen im Standard-Medium. Im Versuch mit einer Olaparib- oder Etoposid-Vorbehandlung hatte der Glukosegehalt des Mediums ebenfalls keinen nennenswerten Einfluss auf die Zytotoxizität (Abbildung 38). Sowohl unter Low- als auch High-Glukose-Bedingungen blieb das Muster der Zellviabilität und Apoptose bei Koinkubation mit NK-Zellen mit Olaparib stabil. Auffällig ist jedoch eine deutlich höhere Signifikanz in den abgebildeten Werten von Abbildung 38. Zudem kommt es zu einer Signifikanz bei den Tumorzellen in Monokultur: TY82-Zellen mit einer Olaparib-Behandlung, aber ohne NK-Zellen, zeigen einen signifikanten Anstieg der nekrotischen Zellen. Zusätzlich kommt es bei einer Vorbehandlung der Tumorzellen mit Etoposid zu einem signifikanten Abfall der viablen Zellen mit einem gleichzeitigen signifikanten Anstieg der nekrotischen Zellen. Es konnte zusätzlich beobachtet

werden, dass die Chemotherapeutika Olaparib und Etoposid in Monotherapie unter verringerter Glukose signifikante Erhöhungen der nekrotischen Werte aufwiesen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit früheren Studien, die einen Zusammenhang zwischen metabolischem Stress und einer erhöhten Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika bestätigten (Khajah et al., 2022). Um diese Beobachtung zu bestätigen, könnte man in weiteren Experimenten die Chemotherapie-Dauer erhöhen, oder eventuell eine Kombinationstherapie von Cisplatin und Etoposid durchführen. Mehrere Studien haben belegt, dass die Verabreichung einer kohlenhydratarmen ketogenen Diät an Mäuse zu einer signifikanten Verringerung des Wachstums und der Metastasierung von Brustkrebs und einem verlängerten Überleben führte (Hopkins et al., 2018; Zou et al., 2020). Eine mögliche Beteiligung von NK-Zellen an der Tumorzell-Zytotoxizität wäre unter diesen Voraussetzungen naheliegend gewesen; jedoch lieferten die hier vorliegenden experimentellen Ergebnisse keinerlei Hinweise auf eine entsprechende Wirkung. Der Glukoseentzug allein reichte nicht aus, um in der Monokultur einen signifikanten Zelluntergang hervorzurufen. Die Viabilität blieb mit etwa 95% stabil, unabhängig von der Inkubationsdauer. Interessant wären vergleichbare Versuche mit der Zelllinie HepG2. Die drastische Reduktion der Zellviabilität auf unter 15% nach 24-stündiger Koinkubation mit NK-Zellen deutet darauf hin, dass auch unter Low-Glucose-Bedingungen die antitumorale Wirkung der NK-Zellen unverändert stark auftritt. Ein signifikanter Anstieg der früh- und spät-apoptotischen Zellen belegt diesen Effekt zusätzlich. Ein möglicher Grund für die unveränderten Ergebnisse im Vergleich zu Zellen, die im Standardmedium kultiviert wurden, könnte darin liegen, dass eine Hemmung der Glykolyse alternative Wege reaktivieren kann. Aus genau diesem Grund wird derzeit an neuen Strategien gearbeitet, um mehrere Stoffwechselwege ins Visier zu nehmen, um das Wachstum und Wiederauftreten von Krebs zu verhindern (Bishayee et al., 2023).

Zusammenfassend kann man sagen, dass der Vergleich von Low-Glucose- mit High-Glucose-Kulturbedingungen keine wesentlichen Unterschiede im Hinblick auf die Induktion von Apoptose oder den Rückgang der Zellviabilität zeigt. Dies legt nahe, dass die Glukosekonzentration unter diesen experimentellen Bedingungen keinen modulierenden Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität hatte.

5.5 PVR-abhängige Modulation der NK-Zell-Effektorfunktion in der Koinkubation mit Tumorzellen

Das Immuncheckpoint-Molekül CD155 (PVR) spielt eine zentrale Rolle in der Tumorbilogie. Es besteht aus einem Transmembran-Glykoprotein, dessen Isoform eine wichtige ITIM-Domäne für inhibitorische Signale enthält. CD155 findet sich in Tumoren stark überexprimiert und begünstigt Tumorstadium und Tumorausbreitung. Es interagiert mit verschiedenen Rezeptoren auf NK-Zellen und kann so zu einem

„Immune escape“ der Tumorzellen führen: aktivierend (DNAM-1, CD96) und inhibierend (TIGIT).

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, die Wirkung einer Koinkubation von NK-Zellen auf die Expression von PVR in Tumorzellen zu analysieren, wobei TY82- und HepG2-Zellen als Modellsysteme verwendet wurden. Darüber hinaus wurde geprüft, ob eine Vorbehandlung mit dem Chemotherapeutikum Etoposid synergistische Effekte in Bezug auf die PVR-Expression und Zellviabilität induzieren kann.

PVR-Expression nach Koinkubation mit NK-Zellen

Eine erste Koinkubation über 24 Stunden führte zu einer nahezu vollständigen Abnahme der Tumorzellviabilität, was durch eine ausgeprägte Zombie Violet-Positivität dokumentiert wurde (Abbildung 42). Diese ausgeprägte Zytotoxizität verhinderte eine auswertbare Aussage zur PVR-Expression, da die verbleibenden lebenden Zellen nicht repräsentativ für die gesamte Population waren. Der Befund verdeutlicht die hohe Effektivität der NK-Zellen gegenüber den untersuchten Tumorzellen, insbesondere gegenüber TY82-Zellen, was auf eine ausgeprägte Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber Immunzellen hinweist. Auffällig ist jedoch, dass sich bei der Bestimmung der Tumorzellviabilität mittels AnnexinV/7AAD-Färbung nach 48-stündiger Koinkubation ein Anteil lebender Zellen von unter 10 % bei TY82- und etwa 45 % bei HepG2-Zellen ergab (Abbildung 19). Im Vergleich dazu zeigte die Zombie Violet-Färbung hier bereits nach 24 Stunden Koinkubation eine noch geringere Viabilität mit weniger als 5 % lebensfähiger Zellen für die TY82-Zellen und etwa 10 % für die HepG2-Zellen (Abbildung 42). Es gibt verschiedene Ansätze zur Erklärung dieser Diskrepanz: Unterschiede zwischen Zelllinien in der Membranzusammensetzung und damit der Membrandurchlässigkeit für Apoptosemarker-Farbstoffe können die Vergleichbarkeit zwischen Zelllinien verringern. Eine weitere Möglichkeit könnte auch in der unterschiedlichen Sensitivität und Bindungscharakteristik der verwendeten Färbemethoden liegen: Annexin V bindet an Phosphatidylserin, das früh in der Apoptose aufgrund des Verlusts der Asymmetrie der Lipiddoppelschicht der Zellmembran von der Innenseite auf die Außenseite transloziert. 7AAD ist DNA-bindender Kernfarbstoff, der nur in Zellen mit permeabler Membran (also spät apoptotisch oder nekrotisch) eindringen kann (Zembruski et al., 2012; Zimmermann and Meyer, 2011). Zombie Violet ist ein aminreaktiver Farbstoff, der irreversibel an freie primäre Amine bindet, die bei Verlust der Membranintegrität zugänglich werden. Es erkennt Zellmembranschädigung als Marker für Zelltod, ist aber nicht Apoptose-spezifisch und weniger sensitiv für frühe apoptotische Ereignisse. Das bedeutet: Zombie Violet kann bereits bei leichter, reversibler Membranschädigung färben, also ohne dass Apoptose ausgelöst wurde (BioLegend, 2025). Dieser Umstand könnte den deutlich stärkeren Vitalitätsverlust in den Tumorzellen im Vergleich zu den Zytotoxizitätsanalysen mittels 7AAD/Annexin V-Färbung erklären.

Nach Anpassung der Koinkubationsdauer auf zwei Stunden konnte eine signifikante Erhöhung der Zellviabilität erreicht werden, wodurch eine validierbare Auswertung der

PVR-Expression möglich wurde. Dabei zeigte sich sowohl bei TY82-, als auch bei den HepG2-Zellen ein Rückgang der PVR-Expression, der in Form eines Anteils PVR-positiver Zellen sowie über die mediane Fluoreszenzintensität (MeFI) dargestellt wurde. Dieser Rückgang war bei TY82-Zellen stärker ausgeprägt, wobei die Unterschiede jedoch keine statistische Signifikanz erreichten. Die Analyse der HepG2-Zellen ergab eine signifikante Abnahme des PVR-Signals, was auf einen direkten Effekt der NK-Zell-Kontaktaufnahme auf die PVR-Expression hindeutet (Abbildung 43). Diese Beobachtungen könnten bedeuten, dass PVR ein dynamisch reguliertes Oberflächenmolekül ist. Bisher wird in der Literatur nur eine Überexpression auf Tumorzellen beschrieben (Lupo and Matosevic, 2020; Masson et al., 2001). Eine reduzierte Expression könnte ein Mechanismus der Immunflucht darstellen, ähnlich wie es für andere Immun-Checkpoint-Liganden (z. B. PD-L1) beschrieben ist. PD-L1 wird beispielsweise auf Lungenkarzinomen durch Zytokine in der Umgebung auf Tumorzellen hochreguliert. Durch die Expression kann der Tumor die Aktivität von T-Zellen herunter regulieren und so einem Immunangriff entgehen (Jiang et al., 2019).

PVR-Expression nach Vorbehandlung mit Etoposid und anschließender Koinkubation mit NK-Zellen

Im zweiten Teil des Versuchs wurde untersucht, ob eine 24-stündige Vorbehandlung der Tumorzellen mit dem Chemotherapeutikum Etoposid zu einer verstärkten PVR-Expressionsänderung und/oder einem erhöhten Zelltod bei anschließender Koinkubation mit NK-Zellen führt. Die Analyse ergab jedoch, dass die Vorbehandlung mit Etoposid keinen zusätzlichen oder synergistischen Effekt auf die PVR-Expression hatte. Sowohl der Anteil PVR-positiver Zellen als auch die MeFI-Werte zeigten vergleichbare Abnahmen wie in der alleinigen Koinkubation ohne Etoposid. Zudem wurde auch bei der kombinierten Behandlung eine deutlich reduzierte Zellviabilität beobachtet, insbesondere bei den TY82-Zellen, bei denen die Überlebensrate auf etwa 25 % sank (Abbildung 44). Dies untermauert die bereits zuvor beobachtete hohe Sensitivität dieser Zelllinie gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität. Dieser Befund legt nahe, dass die regulierenden Mechanismen der PVR-Expression primär durch Zell-Zell-Interaktionen mit NK-Zellen und weniger durch die DNA-schädigende Wirkung von Etoposid beeinflusst werden. Etoposid ist ein Topoisomerase II-Hemmer, welcher zu einem Stopp der Tumorphiliferation führen kann. In vorherigen Versuchen mit Proliferationsraten unter Etoposid-Behandlung zeigten HepG2-Zellen eine Etoposid Sensitivität schon deutlich vor 24 Stunden ab einer Konzentration der hier gegebenen 100 nM. TY82-Zellen reagierten kaum auf das Chemotherapeutikum (Abbildung 30). Trotz dieser Vorergebnisse ließ sich bei den HepG2-Zellen keine signifikante Reduzierung nach einer Etoposid-Behandlung der Tumorzellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisen. Der geringe Unterschied in der Viabilität zwischen Etoposid-vorbehandelten und unbehandelten Zellen lässt darauf schließen, dass Etoposid keinen nennenswerten Effekt auf die „Anfälligkeit“ gegenüber NK-Zellen hat, zumindest in dem hier untersuchten Konzentrationsbereich und Zeitfenster.

Die hier gewonnenen Ergebnisse sind von hoher Relevanz für die Weiterentwicklung immunonkologischer Therapieansätze, insbesondere im Hinblick auf seltene Tumorarten wie das Thymuskarzinom. Die Reduktion der PVR-Expression durch direkten NK-Zell-Kontakt könnte eine potenzielle Immunfluchtstrategie der Tumorzellen darstellen, was in zukünftigen Studien durch Blockadeexperimente (z. B. mit anti-PVR-Antikörpern oder DNAM-1-Inhibition) weiter untersucht werden sollte. Darüber hinaus könnten Experimente mit verlängerten Zeitverläufen der Chemotherapie und Echtzeit-Vitalitätsassays (z. B. mit Life-Cell-Imaging) helfen, den zeitlichen Verlauf der PVR-Modulation und der Zellschädigung noch präziser zu charakterisieren. Langfristig könnten solche *In-vitro*-Modelle mit Sphäroiden ergänzt werden, um das komplexe Zusammenspiel in der Tumormikroumgebung besser nachvollziehen zu können.

5.6 Etablierung von 3D-Tumormodellen mit den Tumorzelllinien TY82 und HepG2

In den letzten Jahrzehnten haben Studien belegt, dass 2D-Kulturen die komplexen physiologische Bedingungen von Tumoren unzureichend nachbilden, weshalb ihre Ergebnisse häufig nicht auf präklinische oder klinische Modelle übertragbar sind. 3D-Tumorsphäroid-Modelle, die in den 1970er Jahren entwickelt wurden, bieten durch ihre realitätsnähere Nachbildung der Tumorstruktur, Zell-Zell-Interaktionen und Mikroumgebung deutliche Vorteile. Sie schließen die Lücke zwischen der klassischen Zellkultur und Tiermodellen. Sie stellen ein vielversprechendes Instrument in und für die Arzneimittelforschung dar (Ravi et al., 2017; Sutherland and Durand, 1976; Weiswald et al., 2015).

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung von Tumorsphäroiden aus den Tumorzelllinien TY82 und HepG2 als alternative Testmodelle für weiterführende Untersuchungen mit Chemotherapeutika und zur Koinkubation mit NK-Zellen. Die Kultivierung aus Einzelzellen beider Zelllinien ermöglichte innerhalb weniger Tage die Bildung definierter und stabiler Sphäroide. Hierzu wurde die Methode der „Ultra low attachment plates“ verwendet. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Sphäroidbildung bei TY82-Zellen bereits ab Tag 1 effizient und kompakt erfolgte, während HepG2-Zellen eine verzögerte, locker aggregierte Morphologie aufwiesen (Abbildung 45 und Abbildung 46). Diese Unterschiede spiegeln die zelltyp-spezifische Fähigkeit zur Zell-Zell-Adhäsion und zur Ausbildung interzellulärer Interaktionen wider. Ein entscheidendes Kriterium bei der Generierung der Sphäroide war die Kontrolle des Durchmessers unterhalb der kritischen Schwelle von 500 μm , da darüber hinaus zentrale Hypoxiezonen und Nekrosen, auch Hypoxischer Kern genannt, entstehen können (Chiew et al., 2017; Shen et al., 2021). Besonders TY82-Sphäroide überschritten diese Größe bereits ab Tag 2 bei einer Zellanzahl von ≥ 20.000 Zellen pro Well. Zentrale kreisförmige Verdunklungen, die morphologisch einem hypoxischen Kern ähneln, konnte bei den Sphäroiden beobachtet werden. Eine definitive Bestätigung erfordert

jedoch weiterführende Analysen. Morphologische Veränderungen, Verlust der Kompaktheit und Zellablösung wurden ab Tag 4 deutlich, was eine strukturelle Instabilität größerer Aggregate verdeutlicht. Bei den HepG2-Zellen traten vergleichbare Veränderungen verzögert auf; Sphäroide bis 20.000 Zellen waren bis Tag 13 überraschend stabil, sofern die kritische Größe (500 μm) nicht überschritten wurde.

Für die TY82-Zelllinie erwies sich für die Herstellung der Sphäroide eine Startzellzahl von 10.000 als optimal. Die Sphäroide wiesen an Tag 3 bis 4 eine kompakte, runde Struktur ohne hypoxische Anzeichen auf, was diesen Zeitraum für funktionelle Experimente wie Substanztestungen und NK-Koinkubationen besonders geeignet erscheinen lässt. Für HepG2 konnten stabile Sphäroide mit 5.000 Zellen über einen Zeitraum von bis zu acht Tagen beobachtet werden – ebenfalls ohne strukturellen Zerfall oder Zellverlust. Dies macht diese Konfiguration für längerfristige Experimente geeignet. Obwohl die generierten Sphäroide in ihrer Morphologie stabil waren, fehlen bislang funktionelle Validierungen auf molekularer Ebene, etwa zur Expression tumorspezifischer Marker oder zur Analyse der intratumoralen Hypoxie. Zukünftige Arbeiten sollten zudem die Einbindung von stromalen Zellen oder extrazellulärer Matrix evaluieren, um die Komplexität des Tumormikromilieus noch realistischer abzubilden. Ferner könnte eine automatisierte Bildanalyse zur objektiven Quantifizierung der Sphäroidstruktur und -größe beitragen.

Im Verlauf der Kultivierung konnte in beiden Zelllinien vermehrt einzelne Zellen in der Umgebung der Sphäroide beobachtet werden. Dieser Effekt trat bei den TY82-Zellen früher und ausgeprägter auf als bei den HepG2-Zellen. Unter dem Lichtmikroskop konnten dabei keinen apoptotischen Body beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung für die Zellablösung könnte der Verlust von Zell-Zell-Kontakten und die daraus resultierende Apoptose sein. *Haga et al.* beschrieben in einer Studie, dass in Caski-Tumorzellen E-cadherin-abhängige Zell-Zell-Interaktionen als Auslöser apoptotischer Signale fungieren können (Haga et al., 2008). In Analogie dazu könnte angenommen werden, dass auch in den hier untersuchten Modellen der Verlust von Zell-Zell-Kontakten im Randbereich der Sphäroide zur Apoptose führt. Dieser Zusammenhang könnte in weiterführenden Untersuchungen experimentell überprüft werden.

Ein vielversprechender Ausblick für weiterführende Experimente liegt in der Etablierung von Koinkubationen der erzeugten Tumorsphäroide mit NK-Zellen. Dabei könnten sowohl Infiltrationstiefe als auch zytotoxische Wirksamkeit von NK-Zellen innerhalb der Sphäroide untersucht werden, um deren Effektivität im Tumormikromilieu besser zu bewerten. In vergleichbaren Studien demonstrierten beispielsweise *Giannattaio et al.* und *Courau et al.* und *Lanuza et al.*, dass NK-Zellen in der Lage sind, in Tumorsphäroide einzuwandern und dort Apoptose in Tumorzellen zu induzieren. Diese Arbeit unterstreicht das Potenzial von 3D-Koinkubationsmodellen zur Untersuchung immunologischer Zell-Zell-Interaktionen sowie zytotoxischer Therapiestrategien (Courau et al., 2019; Giannattasio et al., 2015; Lanuza et al., 2018).

Analog dazu könnten in den hier etablierten Sphäroiden (TY82 und HepG2) Modelle entwickelt werden, um die Infiltration von NK-Zellen zeitabhängig mittels Immunfluoreszenz oder konfokaler Mikroskopie zu visualisieren. Parallel könnten funktionelle Parameter wie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die Expression von Aktivierungsmarkern auf NK-Zellen oder die Quantifizierung apoptotischer Marker in den Tumorzellen analysiert werden. Insbesondere die Etablierung von Sphäroidmodellen aus der Thymuskarzinom-Zelllinie TY82 stellt einen bedeutenden Fortschritt für die onkologische Forschung dar. Thymuskarzinome gehören zu den seltensten malignen Tumoren des vorderen Mediastinums, dabei sind die Primärtumoren aufgrund ihrer geringen Inzidenz sowie limitierter chirurgischer Verfügbarkeit nur schwer zugänglich. In diesem Kontext bieten dreidimensionale Zellkulturmodelle wie Tumorsphäroide eine vielversprechende Alternative zu den seltenen chirurgischen Materialien dar (Nagata et al., 2024).

Dreidimensionale Sphäroide sind eine wichtige Verbindung zwischen übersichtlichen Monolayer-Zellkulturversuchen und der Situation im lebenden Organismus. Frühe Stadien der Tumorentstehung lassen sich standardisiert untersuchen, eine vollständige Übertragbarkeit auf *in vivo*-Bedingungen ist jedoch begrenzt, da zentrale Faktoren wie Hormone, Zytokine und Angiogenese (noch) nicht ausreichend abgebildet werden. Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit lagen keine publizierten Daten über die Erzeugung oder Charakterisierung von Sphäroiden aus Thymuskarzinomzellen vor. Erst im Verlauf der letzten Jahre erschienen vereinzelt erste Studien, die TY82-basierte Sphäroidmodelle beschreiben (z. B. (Knitsch et al., 2021)), jedoch bleibt die Datenlage insgesamt äußerst begrenzt. Dies unterstreicht die Relevanz und Dringlichkeit, entsprechende Modelle systematisch zu etablieren und zu validieren, um der Forschung an dieser seltenen Tumorentität neue Impulse zu geben. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Tumorsphäroide aus den Zelllinien TY82 und HepG2 erfolgreich etabliert werden konnten und als reproduzierbares 3D Modellsystem für weiterführende Versuche zur Verfügung stehen.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das Immunsystem des Menschen besteht aus dem angeborenen und dem erworbenen Teil, die eng miteinander interagieren, sich jedoch in Schnelligkeit und Spezifität ihrer Reaktion unterscheiden. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Teil des angeborenen Immunsystems und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, entartete oder virusinfizierte Zellen ohne vorherige Antigenpräsentation zu erkennen und abzutöten. Ihre Funktion basiert auf einem Gleichgewicht aus inhibitorischen und aktivierenden Rezeptorsignalen, wobei ein Verlust der MHC-I-Expression auf Zielzellen zu ihrer Aktivierung führt. NK-Zellen eliminieren Zielzellen vor allem durch Freisetzung zytotoxischer Granula, die Apoptose-induzierende Signalwege aktivieren. Im Kontext der Tumorummunologie gewinnen NK-Zellen zunehmend an Bedeutung, da sie über das Potenzial verfügen, nicht nur Primärtumoren, sondern auch Metastasen effektiv zu bekämpfen. Bereits in den 1970er-Jahren wurde ihre Rolle in der immunologischen Tumorüberwachung erkannt. Angesichts steigender Krebsinzidenzen in industrialisierten Ländern und der Fähigkeit von Tumorzellen, dem Immunsystem zu „entgehen“, rückt die Entwicklung NK-Zell-basierter Immuntherapien zunehmend in den Fokus. Aufgrund dieser Eigenschaften gelten NK-Zellen als vielversprechender Bestandteil zukünftiger immuntherapeutischer Strategien in der Onkologie.

Ziel dieser Dissertation war es, die bisherigen Erkenntnisse zur anti-tumoralen Aktivität von NK-Zellen zu erweitern. Im Zentrum der experimentellen Untersuchungen stand die Analyse des Einflusses von NK-Zellen auf die Viabilität von Tumorzellen in einem etablierten Koinkubationsmodell. Dabei wurden sowohl das Ausmaß der durch NK-Zellen vermittelten Zytotoxizität als auch die Induktion apoptotischer Prozesse mittels durchflusszytometrischer Verfahren untersucht. Zudem sollte die Expression des Poliovirusrezeptors (PVR), der die Proliferation und Invasion von Krebszellen fördert, auf Tumorzellen sowie seine Modulation im Kontakt mit NK-Zellen analysiert werden. Ein weiterer Schwerpunkt lag auf der Evaluierung möglicher synergistischer Effekte zwischen den Anti-Tumoraktivitäten von ausgewählten Chemotherapeutika bei anschließender Inkubation der Tumorzellen mit NK-Zellen. Auch die Auswirkungen einer Glukosereduzierung im Tumormedium auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität sollten näher betrachtet werden. Hierbei sollte überprüft werden, ob eine kombinierte Anwendung die antitumorale Wirksamkeit der NK-Zellen gegenüber den verwendeten Tumorzelllinien gesteigert werden kann. Ergänzend dazu wurde die Etablierung eines dreidimensionalen Tumormodells auf Sphäroidbasis angestrebt, um zukünftig physiologisch relevantere Bedingungen für weiterführende Analysen zu schaffen. Für sämtliche Untersuchungen kamen die Tumorzelllinien HepG2 und TY82 zum Einsatz.

Die Auswertung der Versuchsergebnisse zeigt deutlich, dass eine Koinkubation mit NK-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Tumorzellviabilität führte, vor allem durch die Induktion von Apoptose. Bei den HepG2- und TY82-Zellen wurde bereits in der frühen Interaktionsphase eine ausgeprägte zytotoxische Aktivität beobachtet,

begleitet von einer schnellen NK-Zell-Aktivierung (Degranulation) und einer erhöhten GLUT-1-Expression. Die getestete Kombinationstherapie mit Chemotherapeutika (Etoposid, Cisplatin) führte zu keinen synergistischen Effekten. Es deutet im Gegenteil auf mögliche negative Wechselwirkungen hin, was die Notwendigkeit einer sorgfältigen Optimierung hinsichtlich Dosis und zeitlicher Abfolge betont. Darüber hinaus zeigte der PARP-Inhibitor Olaparib, der zur Behandlung von Ovarialkarzinomen verwendet wird, nur eine begrenzte immunmodulatorische Wirkung in frühen Phasen der Koinkubation, aber ebenfalls keinen synergistischen Effekt. Der beobachtete Zelluntergang ab 48 Stunden legt nahe, dass weitere Studien zur Rolle nicht-apoptotischer Zelltodmechanismen wie Parthanatos erforderlich sind. Weitere Modalitäten während des Versuches, wie eine unterschiedliche Glukosekonzentrationen im Kulturmedium hatten keinen signifikanten Einfluss auf die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität. Ebenso wurde in beiden Zelllinien ein Rückgang der PVR-Expression nach NK-Zell-Kontakt festgestellt, wobei dieser bei HepG2 statistisch signifikant war und einen direkten regulatorischen Effekt vermuten lässt. Abschließend konnten erfolgreich dreidimensionale Tumorsphäroide aus TY82- und HepG2-Zellen etabliert werden, die ein valides präklinisches Modell zur weiterführenden Untersuchung der NK-Zell-basierten Immuntherapie darstellen.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass der direkte Kontakt mit Tumorzellen zu einer signifikanten Steigerung der zytotoxischen Aktivität von NK-Zellen führte, insbesondere gegenüber der soliden Tumorzelllinie TY82. Da Immuntherapien bislang vor allem bei hämatologischen Neoplasien Erfolge verzeichnen, während ihre Wirksamkeit bei soliden Tumoren als limitiert gilt, ist dieser Befund von besonderer Relevanz. Die beobachtete Empfindlichkeit der Chemotherapie-resistenten TY82-Zelllinie gegenüber NK-Zell-vermittelter Zytotoxizität deutet auf ein potenzielles therapeutisches Fenster hin und unterstreicht die Bedeutung der NK-Zellen als vielversprechende Option in der Behandlung solider Tumoren.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Adams, J.M. (2003). Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 17, 2481-2495. <https://doi.org/10.1101/gad.1126903>

Adrain, C. und Martin, S.J. (2001). The mitochondrial apoptosome: a killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends Biochem Sci* 26, 390-397. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01844-8](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01844-8)

Ahmed, R. und Gray, D. (1996). Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science* 272, 54-60. <https://doi.org/10.1126/science.272.5258.54>

Altenberg, B. und Greulich, K.O. (2004). Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. *Genomics* 84, 1014-1020. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.08.010>

Alter, G., Malenfant, J.M. und Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294, 15-22. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.08.008>

Alvarez, B., Garrido, E., Garcia-Sanz, J.A. und Carrera, A.C. (2003). Phosphoinositide 3-kinase activation regulates cell division time by coordinated control of cell mass and cell cycle progression rate. *J Biol Chem* 278, 26466-26473. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300663200>

Amé, J.C., Spenlehauer, C. und De Murcia, G. (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* 26, 882-893.

Ananthakrishnan, A., Gogineni, V. und Saeian, K. (2006). Epidemiology of primary and secondary liver cancers. Präsentiert bei: *Seminars in interventional radiology* (Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New ...).

Andrews, D.M., Sullivan, L.C., Baschuk, N., Chan, C.J., Berry, R., Cotterell, C.L., Lin, J., Halse, H., Watt, S.V., Poursine-Laurent, J., *et al.* (2012). Recognition of the nonclassical MHC class I molecule H2-M3 by the receptor Ly49A regulates the licensing and activation of NK cells. *Nat Immunol* 13, 1171-1177. <https://doi.org/10.1038/ni.2468>

Anft, M., Netter, P., Urlaub, D., Prager, I., Schaffner, S. und Watzl, C. (2020). NK cell detachment from target cells is regulated by successful cytotoxicity and influences cytokine production. *Cellular & molecular immunology* 17, 347-355.

Arzumanian, V.A., Kiseleva, O.I. und Poverennaya, E.V. (2021). The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>

Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430. <https://doi.org/10.1038/nrc821>

Aumüller, G., Aust, G., Conrad, A., Engele, J., Kirsch, J. und Maio, G. (2020). Duale Reihe Anatomie (Thieme).

Barclay, A.N. und Mayrhofer, G. (1981). Bone marrow origin of Ia-positive cells in the medulla rat thymus. *J Exp Med* 153, 1666-1671. <https://doi.org/10.1084/jem.153.6.1666>

Baserga, R. und Morrión, A. (1999). Differentiation and malignant transformation: two roads diverged in a wood. *J Cell Biochem Suppl* 32-33, 68-75. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(1999\)75:32+<68::aid-jcb9>3.0.co;2-0](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(1999)75:32+<68::aid-jcb9>3.0.co;2-0)

Bates, R.C., Edwards, N.S. und Yates, J.D. (2000). Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 36, 61-74. [https://doi.org/10.1016/s1040-8428\(00\)00077-9](https://doi.org/10.1016/s1040-8428(00)00077-9)

Baury, B., Masson, D., McDermott, B.M., Jr., Jarry, A., Blottiere, H.M., Blanchardie, P., Labois, C.L., Lustenberger, P., Racaniello, V.R. und Denis, M.G. (2003). Identification of secreted CD155 isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 175-182. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01560-2](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01560-2)

Becknell, B. und Caligiuri, M.A. (2005). Interleukin-2, interleukin-15, and their roles in human natural killer cells. *Adv Immunol* 86, 209-239. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(04\)86006-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(04)86006-1)

Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40, 845-859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>

BioLegend (2025). Zombie Violet™ Fixable Viability Kit

Zitiert am 14.5.25

URL:<https://www.biolegend.com/de-de/products/zombie-violet-fixable-viability-kit-9341>.

Bishayee, K., Lee, S.H. und Park, Y.S. (2023). The Illustration of Altered Glucose Dependency in Drug-Resistant Cancer Cells. *Int J Mol Sci* 24. <https://doi.org/10.3390/ijms241813928>

Bissell, M.J. (1981). The differentiated state of normal and malignant cells or how to define a "normal" cell in culture. *International review of cytology* 70, 27-100.

Bluman, E.M., Bartynski, K.J., Avalos, B.R. und Caligiuri, M.A. (1996). Human natural killer cells produce abundant macrophage inflammatory protein-1 alpha in response to monocyte-derived cytokines. *J Clin Invest* 97, 2722-2727. <https://doi.org/10.1172/JCI118726>

Blumberg, D., Port, J.L., Weksler, B., Delgado, R., Rosai, J., Bains, M.S., Ginsberg, R.J., Martini, N., McCormack, P.M., Rusch, V., *et al.* (1995). Thymoma: a multivariate

analysis of factors predicting survival. *The Annals of thoracic surgery* 60, 908-913; discussion 914.

Boerman, G.H., van Ostaijen-ten Dam, M.M., Kraal, K.C., Santos, S.J., Ball, L.M., Lankester, A.C., Schilham, M.W., Egeler, R.M. und van Tol, M.J. (2015). Role of NKG2D, DNAM-1 and natural cytotoxicity receptors in cytotoxicity toward rhabdomyosarcoma cell lines mediated by resting and IL-15-activated human natural killer cells. *Cancer Immunol Immunother* 64, 573-583. <https://doi.org/10.1007/s00262-015-1657-9>

Bowers, J.R., Readler, J.M., Sharma, P. und Excoffon, K. (2017). Poliovirus Receptor: More than a simple viral receptor. *Virus Res* 242, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.09.001>

Boyington, J.C., Brooks, A.G. und Sun, P.D. (2001). Structure of killer cell immunoglobulin-like receptors and their recognition of the class I MHC molecules. *Immunol Rev* 181, 66-78. <https://doi.org/10.1034/j.1600-065x.2001.1810105.x>

Braud, V.M., Allan, D.S., O'Callaghan, C.A., Soderstrom, K., D'Andrea, A., Ogg, G.S., Lazetic, S., Young, N.T., Bell, J.I., Phillips, J.H., *et al.* (1998). HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391, 795-799. <https://doi.org/10.1038/35869>

Brayton, C.F. (1986). Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. *Cornell Vet* 76, 61-90.

Brodin, P., Karre, K. und Hoglund, P. (2009). NK cell education: not an on-off switch but a tunable rheostat. *Trends Immunol* 30, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.01.006>

Burger, T., Schaefer, I.M., Kuffer, S., Bohnenberger, H., Reuter-Jessen, K., Chan, J.K., Emmert, A., Hinterthaler, M., Marx, A. und Strobel, P. (2017). Metastatic type A thymoma: morphological and genetic correlation. *Histopathology* 70, 704-710. <https://doi.org/10.1111/his.13138>

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27. <https://doi.org/10.1159/000386035>

Caligiuri, M.A. (2008). Human natural killer cells. *Blood* 112, 461-469. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-09-077438>

Cantuaria, G., Fagotti, A., Ferrandina, G., Magalhaes, A., Nadji, M., Angioli, R., Penalver, M., Mancuso, S. und Scambia, G. (2001). GLUT-1 expression in ovarian carcinoma: association with survival and response to chemotherapy. *Cancer* 92, 1144-1150. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20010901\)92:5<1144::aid-cncr1432>3.0.co;2-t](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010901)92:5<1144::aid-cncr1432>3.0.co;2-t)

Carpenter, A.C. und Bosselut, R. (2010). Decision checkpoints in the thymus. *Nat Immunol* 11, 666-673. <https://doi.org/10.1038/ni.1887>

- Carson, W.E., Giri, J.G., Lindemann, M.J., Linett, M.L., Ahdieh, M., Paxton, R., Anderson, D., Eisenmann, J., Grabstein, K. und Caligiuri, M.A. (1994). Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med* 180, 1395-1403. <https://doi.org/10.1084/jem.180.4.1395>
- Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M. und Smyth, M.J. (2014). The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat Immunol* 15, 431-438. <https://doi.org/10.1038/ni.2850>
- Chang, F., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Blalock, W.L., Franklin, R.A. und McCubrey, J.A. (2003). Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 17, 590-603. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402824>
- Chen, M.F., Hwang, T.L. und Hung, C.F. (1991). Human liver regeneration after major hepatectomy. A study of liver volume by computed tomography. *Ann Surg* 213, 227-229. <https://doi.org/10.1097/00000658-199103000-00008>
- Chiew, G.G.Y., Wei, N., Sultania, S., Lim, S. und Luo, K.Q. (2017). Bioengineered three-dimensional co-culture of cancer cells and endothelial cells: A model system for dual analysis of tumor growth and angiogenesis. *Biotechnol Bioeng* 114, 1865-1877. <https://doi.org/10.1002/bit.26297>
- Cho, H.I., Lee, Y.R. und Celis, E. (2011). Interferon γ limits the effectiveness of melanoma peptide vaccines. *Blood* 117, 135-144. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-298117>
- Chumakov, P.M. (2007). Versatile functions of p53 protein in multicellular organisms. *Biochemistry (Mosc)* 72, 1399-1421. <https://doi.org/10.1134/s0006297907130019>
- Claus, M., Greil, J. und Watzl, C. (2009). Comprehensive analysis of NK cell function in whole blood samples. *J Immunol Methods* 341, 154-164. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.11.006>
- Cohnen, A., Chiang, S.C., Stojanovic, A., Schmidt, H., Claus, M., Saftig, P., Janßen, O., Cerwenka, A., Bryceson, Y.T. und Watzl, C. (2013). Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 122, 1411-1418. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441832>
- Colucci, F., Caligiuri, M.A. und Di Santo, J.P. (2003). What does it take to make a natural killer? *Nat Rev Immunol* 3, 413-425. <https://doi.org/10.1038/nri1088>
- Colucci, F., Di Santo, J.P. und Leibson, P.J. (2002). Natural killer cell activation in mice and men: different triggers for similar weapons? *Nat Immunol* 3, 807-813. <https://doi.org/10.1038/ni0902-807>
- Cooper, A.P. (1832). *The Anatomy of the Thymus Gland* (Longman).

Cooper, M.A., Fehniger, T.A. und Caligiuri, M.A. (2001). The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in immunology* 22, 633-640.

Cory, S. und Adams, J.M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2, 647-656. <https://doi.org/10.1038/nrc883>

Cory, S., Huang, D.C. und Adams, J.M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 22, 8590-8607. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207102>

Courau, T., Bonnereau, J., Chicoteau, J., Bottois, H., Remark, R., Assante Miranda, L., Toubert, A., Blery, M., Aparicio, T., Allez, M., *et al.* (2019). Cocultures of human colorectal tumor spheroids with immune cells reveal the therapeutic potential of MICA/B and NKG2A targeting for cancer treatment. *J Immunother Cancer* 7, 74. <https://doi.org/10.1186/s40425-019-0553-9>

d'AMOURS, D., Desnoyers, S., d'SILVA, I. und Poirier, G.G. (1999). Poly (ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochemical journal* 342, 249-268.

Dasari, S. und Tchounwou, P.B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol* 740, 364-378. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

David, K.K., Andrabi, S.A., Dawson, T.M. und Dawson, V.L. (2009). Parthanatos, a messenger of death. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 14, 1116.

Davis, D.M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G.B., Mandelboim, O. und Strominger, J.L. (1999). The human natural killer cell immune synapse. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 15062-15067.

de Andrade, L.F., Smyth, M.J. und Martinet, L. (2014). DNAM-1 control of natural killer cells functions through nectin and nectin-like proteins. *Immunol Cell Biol* 92, 237-244. <https://doi.org/10.1038/icb.2013.95>

Deuss, F.A., Gully, B.S., Rossjohn, J. und Berry, R. (2017). Recognition of nectin-2 by the natural killer cell receptor T cell immunoglobulin and ITIM domain (TIGIT). *J Biol Chem* 292, 11413-11422. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786483>

Deuss, F.A., Watson, G.M., Fu, Z., Rossjohn, J. und Berry, R. (2019). Structural Basis for CD96 Immune Receptor Recognition of Nectin-like Protein-5, CD155. *Structure* 27, 219-228 e213. <https://doi.org/10.1016/j.str.2018.10.023>

Donnelly, R.P., Loftus, R.M., Keating, S.E., Liou, K.T., Biron, C.A., Gardiner, C.M. und Finlay, D.K. (2014). mTORC1-dependent metabolic reprogramming is a prerequisite for NK cell effector function. *J Immunol* 193, 4477-4484. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401558>

Edwards, C.M., Glisson, B.S., King, C.K., Smallwood-Kentro, S. und Ross, W.E. (1987). Etoposide-induced DNA cleavage in human leukemia cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 20, 162-168. <https://doi.org/10.1007/BF00253972>

Fauriat, C., Long, E.O., Ljunggren, H.G. und Bryceson, Y.T. (2010). Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167-2176. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-08-238469>

Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M. und Caligiuri, M.A. (2003). 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* 101, 3052-3057. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-09-2876>

Fischer, U., Janicke, R.U. und Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401160>

Foster, K.A., Oster, C.G., Mayer, M.M., Avery, M.L. und Audus, K.L. (1998). Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism. *Exp Cell Res* 243, 359-366. <https://doi.org/10.1006/excr.1998.4172>

Freud, A.G. und Caligiuri, M.A. (2006). Human natural killer cell development. *Immunol Rev* 214, 56-72. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2006.00451.x>

Freud, A.G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M.T., Mao, H.C., Ferketich, A.K. und Caligiuri, M.A. (2006). Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo. *J Exp Med* 203, 1033-1043. <https://doi.org/10.1084/jem.20052507>

Fry, A.M., Jones, L.A., Kruisbeek, A.M. und Matis, L.A. (1989). Thymic requirement for clonal deletion during T cell development. *Science* 246, 1044-1046. <https://doi.org/10.1126/science.2511630>

Fuentes-Prior, P. und Salvesen, G.S. (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201-232. <https://doi.org/10.1042/BJ20041142>

Fulda, S. (2009). Cell death in hematological tumors. *Apoptosis* 14, 409-423. <https://doi.org/10.1007/s10495-008-0306-6>

Fulda, S. und Debatin, K.M. (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 25, 4798-4811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209608>

Gaikwad, S., Agrawal, M.Y., Kaushik, I., Ramachandran, S. und Srivastava, S.K. (2022). Immune checkpoint proteins: Signaling mechanisms and molecular

interactions in cancer immunotherapy. *Semin Cancer Biol* 86, 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2022.03.014>

Gasteiger, G., D'Osualdo, A., Schubert, D.A., Weber, A., Bruscia, E.M. und Hartl, D. (2017). Cellular Innate Immunity: An Old Game with New Players. *J Innate Immun* 9, 111-125. <https://doi.org/10.1159/000453397>

Giaccone, G., Ardizzoni, A., Kirkpatrick, A., Clerico, M., Sahmoud, T. und van Zandwijk, N. (1996). Cisplatin and etoposide combination chemotherapy for locally advanced or metastatic thymoma. A phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol* 14, 814-820. <https://doi.org/10.1200/jco.1996.14.3.814>

Giannattasio, A., Weil, S., Kloess, S., Ansari, N., Stelzer, E.H., Cerwenka, A., Steinle, A., Koehl, U. und Koch, J. (2015). Cytotoxicity and infiltration of human NK cells in in vivo-like tumor spheroids. *BMC Cancer* 15, 351. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1321-y>

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. und Parks, W.P. (1973). In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 51, 1417-1423. <https://doi.org/10.1093/jnci/51.5.1417>

Gidlund, M., Orn, A., Wigzell, H., Senik, A. und Gresser, I. (1978). Enhanced NK cell activity in mice injected with interferon and interferon inducers. *Nature* 273, 759-761. <https://doi.org/10.1038/273759a0>

Gillgrass, A., Gill, N., Babian, A. und Ashkar, A.A. (2014). The absence or overexpression of IL-15 drastically alters breast cancer metastasis via effects on NK cells, CD4 T cells, and macrophages. *J Immunol* 193, 6184-6191. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303175>

Gillies, R.J., Robey, I. und Gatenby, R.A. (2008). Causes and consequences of increased glucose metabolism of cancers. *J Nucl Med* 49 Suppl 2, 24S-42S. <https://doi.org/10.2967/jnumed.107.047258>

Giri, J.G., Anderson, D.M., Kumaki, S., Park, L.S., Grabstein, K.H. und Cosman, D. (1995). IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *Journal of leukocyte biology* 57, 763-766.

Glucksmann, A. (1951). Cell deaths in normal vertebrate ontogeny. *Biol Rev Camb Philos Soc* 26, 59-86. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185x.1951.tb00774.x>

Gorsch, S.M., Memoli, V.A., Stukel, T.A., Gold, L.I. und Arrick, B.A. (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52, 6949-6952.

Gowans, J.L., Mc, G.D. und Cowen, D.M. (1962). Initiation of immune responses by small lymphocytes. *Nature* 196, 651-655. <https://doi.org/10.1038/196651a0>

Green, D.R. und Kroemer, G. (2004). The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305, 626-629. <https://doi.org/10.1126/science.1099320>

Haga, T., Uchida, N., Tugizov, S. und Palefsky, J.M. (2008). Role of E-cadherin in the induction of apoptosis of HPV16-positive CaSki cervical cancer cells during multicellular tumor spheroid formation. *Apoptosis* 13, 97-108. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0132-2>

Hansen, R. und Oren, M. (1997). p53; from inductive signal to cellular effect. *Curr Opin Genet Dev* 7, 46-51. [https://doi.org/10.1016/s0959-437x\(97\)80108-6](https://doi.org/10.1016/s0959-437x(97)80108-6)

Hengartner, M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776. <https://doi.org/10.1038/35037710>

Hermeking, H. und Eick, D. (1994). Mediation of c-Myc-induced apoptosis by p53. *Science* 265, 2091-2093. <https://doi.org/10.1126/science.8091232>

Herzenberg, L.A., Parks, D., Sahaf, B., Perez, O., Roederer, M. und Herzenberg, L.A. (2002). The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. *Clin Chem* 48, 1819-1827.

Herzenberg, L.A., Tung, J., Moore, W.A., Herzenberg, L.A. und Parks, D.R. (2006). Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol* 7, 681-685. <https://doi.org/10.1038/ni0706-681>

Hicklin, D.J., Marincola, F.M. und Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 5, 178-186. [https://doi.org/10.1016/s1357-4310\(99\)01451-3](https://doi.org/10.1016/s1357-4310(99)01451-3)

Hill, M.M., Adrain, C. und Martin, S.J. (2003). Portrait of a killer: the mitochondrial apoptosome emerges from the shadows. *Mol Interv* 3, 19-26. <https://doi.org/10.1124/mi.3.1.19>

Hockenbery, D.M., Oltvai, Z.N., Yin, X.M., Millman, C.L. und Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 75, 241-251. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)80066-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)80066-n)

Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A. und Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284, 1313-1318. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1313>

Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J. und Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76, 17-27. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90169-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90169-4)

- Hopkins, B.D., Pauli, C., Du, X., Wang, D.G., Li, X., Wu, D., Amadiume, S.C., Goncalves, M.D., Hodakoski, C., Lundquist, M.R., *et al.* (2018). Suppression of insulin feedback enhances the efficacy of PI3K inhibitors. *Nature* 560, 499-503. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0343-4>
- Horn, F., Moc, I., Schneider, N., Grillhösl, C., Berghold, S. und Lindenmeier, G. (2005). *Biochemie des Menschen. 3. grundlegend überarbeitete und erweiterte Auflage.* Stuttgart: Thieme Verlag, S 479, 352.
- Hörner, C., Bouchon, A., Bierhaus, A., Nawroth, P.P., Martin, E., Bardenheuer, H.J. und Weigand, M.A. (2004). [Role of the innate immune response in sepsis]. *Anaesthesist* 53, 10-28. <https://doi.org/10.1007/s00101-003-0626-4>
- Huang, P., Chen, G., Jin, W., Mao, K., Wan, H. und He, Y. (2022). Molecular Mechanisms of Parthanatos and Its Role in Diverse Diseases. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23137292>
- Hulspas, R., O'Gorman, M.R., Wood, B.L., Gratama, J.W. und Sutherland, D.R. (2009). Considerations for the control of background fluorescence in clinical flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 76, 355-364. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.20485>
- Igney, F.H. und Krammer, P.H. (2002). Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71, 907-920.
- Iguchi-Manaka, A., Okumura, G., Kojima, H., Cho, Y., Hirochika, R., Bando, H., Sato, T., Yoshikawa, H., Hara, H., Shibuya, A., *et al.* (2016). Increased Soluble CD155 in the Serum of Cancer Patients. *PLoS One* 11, e0152982. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152982>
- Jagtap, P. und Szabó, C. (2005). Poly (ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. *Nature reviews Drug discovery* 4, 421-440.
- Jewett, A., Man, Y.-g., Cacalano, N., Kos, J. und Tseng, H.-C. (2014). Natural killer cells as effectors of selection and differentiation of stem cells: role in resolution of inflammation. *Journal of immunotoxicology* 11, 297-307.
- Jiang, Y., Chen, M., Nie, H. und Yuan, Y. (2019). PD-1 and PD-L1 in cancer immunotherapy: clinical implications and future considerations. *Hum Vaccin Immunother* 15, 1111-1122. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1571892>
- Johnston, R.J., Comps-Agrar, L., Hackney, J., Yu, X., Huseni, M., Yang, Y., Park, S., Javinal, V., Chiu, H., Irving, B., *et al.* (2014). The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8(+) T cell effector function. *Cancer Cell* 26, 923-937. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2014.10.018>
- Kammula, U.S., White, D.E. und Rosenberg, S.A. (1998). Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer* 83, 797-805.

- Kao, G.D., McKenna, W.G. und Yen, T.J. (2001). Detection of repair activity during the DNA damage-induced G2 delay in human cancer cells. *Oncogene* 20, 3486-3496. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204445>
- Kappler, J.W., Roehm, N. und Marrack, P. (1987). T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49, 273-280. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90568-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90568-x)
- Karre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. und Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678. <https://doi.org/10.1038/319675a0>
- Kärre, K., Ljunggren, H.G., Piontek, G. und Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675-678. <https://doi.org/10.1038/319675a0>
- Kartalou, M. und Essigmann, J.M. (2001). Mechanisms of resistance to cisplatin. *Mutat Res* 478, 23-43. [https://doi.org/10.1016/s0027-5107\(01\)00141-5](https://doi.org/10.1016/s0027-5107(01)00141-5)
- Kasahara, K., Fujiwara, Y., Sugimoto, Y., Nishio, K., Tamura, T., Matsuda, T. und Saijo, N. (1992). Determinants of response to the DNA topoisomerase II inhibitors doxorubicin and etoposide in human lung cancer cell lines. *J Natl Cancer Inst* 84, 113-118. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.2.113>
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. und Craig, R.W. (1991). Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51, 6304-6311.
- Keil, G., Rudolf, R., Schmitt, W. und Vermeer, H.J. (2017). Fachliteratur des Mittelalters: Festschrift für Gerhard Eis (J.B. Metzler).
- Kennedy, M.K., Glaccum, M., Brown, S.N., Butz, E.A., Viney, J.L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C.R., *et al.* (2000). Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med* 191, 771-780. <https://doi.org/10.1084/jem.191.5.771>
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. und Currie, A.R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Khajah, M.A., Khushaish, S. und Luqmani, Y.A. (2022). Glucose deprivation reduces proliferation and motility, and enhances the anti-proliferative effects of paclitaxel and doxorubicin in breast cell lines in vitro. *PLoS One* 17, e0272449. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0272449>
- Khalifian, S., Raimondi, G. und Brandacher, G. (2015). The use of luminex assays to measure cytokines. *J Invest Dermatol* 135, 1-5. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.36>

- Kiessling, R., Klein, E. und Wigzell, H. (1975). "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 5, 112-117. <https://doi.org/10.1002/eji.1830050208>
- Kim, D. und Nam, H.J. (2022). PARP Inhibitors: Clinical Limitations and Recent Attempts to Overcome Them. *Int J Mol Sci* 23. <https://doi.org/10.3390/ijms23158412>
- Kirman, J.R., Quinn, K.M. und Seder, R.A. (2019). Immunological memory. *Immunol Cell Biol* 97, 615-616. <https://doi.org/10.1111/imcb.12280>
- Kirschner, P.A. (2000). The history of surgery of the thymus gland. *Chest Surg Clin N Am* 10, 153-165, x.
- Kischkel, F.C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P.H. und Peter, M.E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 14, 5579-5588.
- Kiseleva, O.I., Kurbatov, I.Y., Arzumanyan, V.A., Ilgisonis, E.V., Zakharov, S.V. und Poverennaya, E.V. (2023). The Expectation and Reality of the HepG2 Core Metabolic Profile. *Metabolites* 13. <https://doi.org/10.3390/metabo13080908>
- Kisielow, P., Teh, H.S., Bluthmann, H. und von Boehmer, H. (1988). Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules. *Nature* 335, 730-733. <https://doi.org/10.1038/335730a0>
- Kloess, S., Kretschmer, A., Stahl, L., Fricke, S. und Koehl, U. (2019). CAR-expressing natural killer cells for cancer retargeting. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* 46, 4-13.
- Knitsch, R., AlWahsh, M., Raschke, H., Lambert, J. und Hergenröder, R. (2021). In Vitro Spatio-Temporal NMR Metabolomics of Living 3D Cell Models. *Anal Chem* 93, 13485-13494. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.1c02221>
- Koike, S., Horie, H., Ise, I., Okitsu, A., Yoshida, M., Iizuka, N., Takeuchi, K., Takegami, T. und Nomoto, A. (1990). The poliovirus receptor protein is produced both as membrane-bound and secreted forms. *EMBO J* 9, 3217-3224. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07520.x>
- Koopman, G., Reutelingsperger, C.P., Kuijten, G.A., Keehnen, R.M., Pals, S.T. und van Oers, M.H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84, 1415-1420.
- Kozłowska, A.K., Topchyan, P., Kaur, K., Tseng, H.-C., Teruel, A., Hiraga, T. und Jewett, A. (2017). Differentiation by NK cells is a prerequisite for effective targeting of cancer stem cells/poorly differentiated tumors by chemopreventive and chemotherapeutic drugs. *Journal of Cancer* 8, 537.

Kucan Brlic, P., Lenac Rovis, T., Cinamon, G., Tsukerman, P., Mandelboim, O. und Jonjic, S. (2019). Targeting PVR (CD155) and its receptors in anti-tumor therapy. *Cell Mol Immunol* 16, 40-52. <https://doi.org/10.1038/s41423-018-0168-y>

Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ* 14, 32-43. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402060>

Kuzume, T., Kubonishi, I., Takeuchi, S., Takeuchi, T., Iwata, J., Sonobe, H., Ohtsuki, Y. und Miyoshi, I. (1992). Establishment and characterization of a thymic carcinoma cell line (Ty-82) carrying t(15;19)(q15;p13) chromosome abnormality. *Int J Cancer* 50, 259-264. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910500216>

Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., *et al.* (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 119, 1251-1263. <https://doi.org/10.1172/JCI36022>

Lamb, M.G., Rangarajan, H.G., Tullius, B.P. und Lee, D.A. (2021). Natural killer cell therapy for hematologic malignancies: successes, challenges, and the future. *Stem Cell Res Ther* 12, 211. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02277-x>

Lanuza, P.M., Vigueras, A., Olivan, S., Prats, A.C., Costas, S., Llamazares, G., Sanchez-Martinez, D., Ayuso, J.M., Fernandez, L., Ochoa, I., *et al.* (2018). Activated human primary NK cells efficiently kill colorectal cancer cells in 3D spheroid cultures irrespectively of the level of PD-L1 expression. *Oncoimmunology* 7, e1395123. <https://doi.org/10.1080/2162402x.2017.1395123>

Lavini, C., Moran, C.A., Morandi, U. und Schoenhuber, R. (2009). *Thymus Gland Pathology: Clinical, Diagnostic and Therapeutic Features* (Springer Milan).

Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J.P., Lanier, L.L. und Phillips, J.H. (1996). Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits. *J Immunol* 157, 4741-4745.

Li, C.W., Young, T.H., Wang, M.H., Pei, M.Y., Hsieh, T.Y., Hsu, C.L. und Cheng, N.C. (2023). Low-glucose culture environment can enhance the wound healing capability of diabetic adipose-derived stem cells. *Stem Cell Res Ther* 14, 236. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03478-2>

Lin, R.Z. und Chang, H.Y. (2008). Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnol J* 3, 1172-1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>

Linstra, R., Stappenbelt, C., Bakker, F.J., Everts, M., Bhattacharya, A., Yu, S., van Bergen, S.D., van der Vegt, B., Wisman, G.B.A., Fehrmann, R.S.N., *et al.* (2025). MYC controls STING levels to downregulate inflammatory signaling in breast cancer cells upon DNA damage. *J Biol Chem*, 108560. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2025.108560>

Lippert, H. und Deller, T. (2011). Lehrbuch Anatomie: 204 Tabellen (Elsevier, Urban & Fischer).

Liu, L., Li, J., Ke, Y., Zeng, X., Gao, J., Ba, X. und Wang, R. (2022). The key players of parthanatos: opportunities for targeting multiple levels in the therapy of parthanatos-based pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 79, 60. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04109-w>

Liu, L., You, X., Han, S., Sun, Y., Zhang, J. und Zhang, Y. (2021). CD155/TIGIT, a novel immune checkpoint in human cancers (Review). *Oncol Rep* 45, 835-845. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7943>

Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. und Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86, 147-157. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80085-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80085-9)

Lockshin, R.A. und Williams, C.M. (1965). Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* 11, 123-133. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(65\)90099-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(65)90099-5)

Loehrer, P.J., Sr., Kim, K., Aisner, S.C., Livingston, R., Einhorn, L.H., Johnson, D. und Blum, R. (1994). Cisplatin plus doxorubicin plus cyclophosphamide in metastatic or recurrent thymoma: final results of an intergroup trial. The Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 12, 1164-1168. <https://doi.org/10.1200/jco.1994.12.6.1164>

Lowry, L.E. und Zehring, W.A. (2017). Potentiation of Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy: A Review of Literature. *Front Immunol* 8, 1061. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01061>

Lozzio, C.B. und Lozzio, B.B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.

Lüllmann-Rauch R., A.E. (2019). Taschenlehrbuch Histologie (Stuttgart Germany: Thieme).

Lupo, K.B. und Matosevic, S. (2020). CD155 immunoregulation as a target for natural killer cell immunotherapy in glioblastoma. *J Hematol Oncol* 13, 76. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00913-2>

Luttmann W., K., B., M., K. und D., M. (2014). Der Experimentator Immunologie, Bd. 4. Auflage (Berlin- Heidelberg: Springer Spektrum).

Macintyre, A.N., Gerriets, V.A., Nichols, A.G., Michalek, R.D., Rudolph, M.C., Deoliveira, D., Anderson, S.M., Abel, E.D., Chen, B.J., Hale, L.P., *et al.* (2014). The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab* 20, 61-72. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.05.004>

- Maltzman, W. und Czyzyk, L. (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol Cell Biol* 4, 1689-1694. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.9.1689-1694.1984>
- Manohar, S. und Leung, N. (2018). Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature. *J Nephrol* 31, 15-25. <https://doi.org/10.1007/s40620-017-0392-z>
- Martinet, L. und Smyth, M.J. (2015). Balancing natural killer cell activation through paired receptors. *Nat Rev Immunol* 15, 243-254. <https://doi.org/10.1038/nri3799>
- Marx, A., Weis, C.A. und Strobel, P. (2016). [Thymomas]. *Pathologe* 37, 412-424. <https://doi.org/10.1007/s00292-016-0223-3>
- Masson, D., Jarry, A., Baur, B., Blanchardie, P., Labois, C., Lustenberger, P. und Denis, M.G. (2001). Overexpression of the CD155 gene in human colorectal carcinoma. *Gut* 49, 236-240. <https://doi.org/10.1136/gut.49.2.236>
- Mendelsohn, C.L., Wimmer, E. und Racaniello, V.R. (1989). Cellular receptor for poliovirus: molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell* 56, 855-865. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90690-9](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90690-9)
- Metcalf, D. (1960). The effect of thymectomy on the lymphoid tissues of the mouse. *Br J Haematol* 6, 324-333. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.1960.tb06248.x>
- Metchnikoff, E. (1902). *Immunität bei Infektionskrankheiten* (Jena: G. Fischer).
- Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G. und Rathmell, J.C. (2011). Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J Immunol* 186, 3299-3303. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1003613>
- Michalopoulos, G.K. und Bhushan, B. (2021). Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 18, 40-55. <https://doi.org/10.1038/s41575-020-0342-4>
- Miller, J.F. (1961). Immunological function of the thymus. *Lancet* 2, 748-749. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(61\)90693-6](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(61)90693-6)
- Molfetta, R., Zitti, B., Lecce, M., Milito, N.D., Stabile, H., Fionda, C., Cippitelli, M., Gismondi, A., Santoni, A. und Paolini, R. (2020). CD155: A Multi-Functional Molecule in Tumor Progression. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030922>
- Molling, J.W., Kolgen, W., van der Vliet, H.J., Boomsma, M.F., Kruizenga, H., Smorenburg, C.H., Molenkamp, B.G., Langendijk, J.A., Leemans, C.R., von Blomberg, B.M., et al. (2005). Peripheral blood IFN-gamma-secreting Valpha24+Vbeta11+ NKT

cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load. *Int J Cancer* 116, 87-93. <https://doi.org/10.1002/ijc.20998>

Morvan, M.G. und Lanier, L.L. (2016). NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16, 7-19. <https://doi.org/10.1038/nrc.2015.5>

Mrozek, E., Anderson, P. und Caligiuri, M.A. (1996). Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87, 2632-2640.

Mueckler, M., Caruso, C., Baldwin, S.A., Panico, M., Blench, I., Morris, H.R., Allard, W.J., Lienhard, G.E. und Lodish, H.F. (1985). Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science* 229, 941-945. <https://doi.org/10.1126/science.3839598>

Mueller-Klieser, W. (1997). Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 273, C1109-C1123.

Murphy, K.M., Mahlke, K., Seidler, L., Travers, P., Haußer-Siller, I. und Walport, M. (2009). *Janeway Immunologie* (Spektrum Akademischer Verlag).

Nagata, H., Funaki, S., Kimura, K., Fukui, E., Kimura, T., Kanou, T., Ose, N., Morii, E. und Shintani, Y. (2024). ACTN4 is associated with the malignant potential of thymic epithelial tumors through the β -catenin/Slug pathway. *Cancer Sci* 115, 3636-3647. <https://doi.org/10.1111/cas.16313>

Nagler, A., Lanier, L.L., Cwirla, S. und Phillips, J.H. (1989). Comparative studies of human FcRIII-positive and negative natural killer cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md: 1950) 143, 3183-3191.

Nath, S. und Devi, G.R. (2016). Three-dimensional culture systems in cancer research: Focus on tumor spheroid model. *Pharmacol Ther* 163, 94-108. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.03.013>

Oltvai, Z.N., Millman, C.L. und Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74, 609-619. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90509-o](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90509-o)

Oren, M. (1999). Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem* 274, 36031-36034. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.51.36031>

Pallas, W.D., Pak, E.S. und Hannan, J.L. (2023). In vitro high glucose increases apoptosis, decreases nerve outgrowth, and promotes survival of sympathetic pelvic neurons. *Sexual Medicine* 11. <https://doi.org/10.1093/sexmed/qfac009>

Papoff, G., Hausler, P., Eramo, A., Pagano, M.G., Di Leve, G., Signore, A. und Ruberti, G. (1999). Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization

domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *J Biol Chem* 274, 38241-38250. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38241>

Penack, O., Gentilini, C., Fischer, L., Asemissen, A.M., Scheibenbogen, C., Thiel, E. und Uharek, L. (2005). CD56dimCD16neg cells are responsible for natural cytotoxicity against tumor targets. *Leukemia* 19, 835-840. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2403704>

Pene, F., Claessens, Y.E., Muller, O., Viguie, F., Mayeux, P., Dreyfus, F., Lacombe, C. und Bouscary, D. (2002). Role of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mTOR/P70S6-kinase pathways in the proliferation and apoptosis in multiple myeloma. *Oncogene* 21, 6587-6597. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205923>

Peroumal, D., Abimannan, T., Tagirasa, R., Parida, J.R., Singh, S.K., Padhan, P. und Devadas, S. (2016). Inherent low Erk and p38 activity reduce Fas Ligand expression and degranulation in T helper 17 cells leading to activation induced cell death resistance. *Oncotarget* 7, 54339-54359. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10913>

Peter, M.E., Heufelder, A.E. und Hengartner, M.O. (1997). Advances in apoptosis research. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12736-12737. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.24.12736>

Pfister, F., Hussain, H., Belharazem, D., Busch, S., Simon-Keller, K., Becker, D., Pfister, E., Rieker, R., Strobel, P. und Marx, A. (2017). Vascular architecture as a diagnostic marker for differentiation of World Health Organization thymoma subtypes and thymic carcinoma. *Histopathology* 70, 693-703. <https://doi.org/10.1111/his.13114>

Pouyssegur, J., Dayan, F. und Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441, 437-443. <https://doi.org/10.1038/nature04871>

Promega (2015). TECHNICAL MANUAL ApoTox-Glo™ Triplex AssayInstructions
Zitiert am: 15.11.2021
URL:<https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/101/apotox-glo-triplex-assay-protocol.pdf?la=en>.

Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. und Deutzmann, R. (2006). Duale Reihe-Biochemie (ISBN 3-13-125351-7)© 2006 Georg Thieme Verlag KG Stuttgart (S).

Ravi, M., Ramesh, A. und Pattabhi, A. (2017). Contributions of 3D Cell Cultures for Cancer Research. *J Cell Physiol* 232, 2679-2697. <https://doi.org/10.1002/jcp.25664>

Rezvani, K. und Rouce, R.H. (2015). The Application of Natural Killer Cell Immunotherapy for the Treatment of Cancer. *Front Immunol* 6, 578. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00578>

Rink, L., Kruse, A. und Haase, H. (2012). Immunologie für Einsteiger (Springer).

Rink, L., Kruse, A., Haase, H. und Lay, M. (2015). Immunologie für Einsteiger (Springer Berlin Heidelberg).

Robertson, M.J. und Ritz, J. (1990). Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421-2438.

Rosenberg, B., Vancamp, L. und Krigas, T. (1965). INHIBITION OF CELL DIVISION IN *ESCHERICHIA COLI* BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature* 205, 698-699. <https://doi.org/10.1038/205698a0>

Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J.E. und Mansour, V.H. (1969). Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 222, 385-386. <https://doi.org/10.1038/222385a0>

Rosenberg, S.A., Lotze, M.T., Yang, J.C., Topalian, S.L., Chang, A.E., Schwartzentruber, D.J., Aebersold, P., Leitman, S., Linehan, W.M., Seipp, C.A., *et al.* (1993). Prospective randomized trial of high-dose interleukin-2 alone or in conjunction with lymphokine-activated killer cells for the treatment of patients with advanced cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 622-632. <https://doi.org/10.1093/jnci/85.8.622>

Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Aversa, F., Martelli, M.F. und Velardi, A. (2007). Natural killer cell alloreactivity in allogeneic hematopoietic transplantation. *Curr Opin Oncol* 19, 142-147. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e3280148a1a>

Sack, U., Tarnok, A. und Rothe, G. (2006). Zelluläre Diagnostik: Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie ; 163 Tabellen (Karger).

Salvesen, G.S. und Dixit, V.M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.20.10964>

Salvesen, G.S. und Duckett, C.S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410. <https://doi.org/10.1038/nrm830>

Sant, S. und Johnston, P.A. (2017). The production of 3D tumor spheroids for cancer drug discovery. *Drug Discov Today Technol* 23, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2017.03.002>

Schenck, K. und Kiyono, H. (2001). Innate and acquired immunity, cytokines, and genetic factors in relation to the mucosal immune system. *Acta Odontol Scand* 59, 121-123. <https://doi.org/10.1080/000163501750266693>

Schweichel, J.U. und Merker, H.J. (1973). The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology* 7, 253-266. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>

Seino, K., Kayagaki, N., Okumura, K. und Yagita, H. (1997). Antitumor effect of locally produced CD95 ligand. *Nat Med* 3, 165-170. <https://doi.org/10.1038/nm0297-165>

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D. und Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81902-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81902-9)

Shen, H., Cai, S., Wu, C., Yang, W., Yu, H. und Liu, L. (2021). Recent Advances in Three-Dimensional Multicellular Spheroid Culture and Future Development. *Micromachines (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/mi12010096>

Shimasaki, N., Jain, A. und Campana, D. (2020). NK cells for cancer immunotherapy. *Nat Rev Drug Discov* 19, 200-218. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0052-1>

Siddik, Z.H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22, 7265-7279. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206933>

Siegel, R.M., Frederiksen, J.K., Zacharias, D.A., Chan, F.K., Johnson, M., Lynch, D., Tsien, R.Y. und Lenardo, M.J. (2000). Fas preassociation required for apoptosis signaling and dominant inhibition by pathogenic mutations. *Science* 288, 2354-2357. <https://doi.org/10.1126/science.288.5475.2354>

Sloan, K.E., Eustace, B.K., Stewart, J.K., Zehetmeier, C., Torella, C., Simeone, M., Roy, J.E., Unger, C., Louis, D.N., Ilag, L.L., *et al.* (2004). CD155/PVR plays a key role in cell motility during tumor cell invasion and migration. *BMC Cancer* 4, 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-4-73>

Smyth, M.J., Hayakawa, Y., Takeda, K. und Yagita, H. (2002). New aspects of natural-killer-cell surveillance and therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 850-861. <https://doi.org/10.1038/nrc928>

Sordo-Bahamonde, C., Vitale, M., Lorenzo-Herrero, S., López-Soto, A. und Gonzalez, S. (2020). Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 12. <https://doi.org/10.3390/cancers12040893>

Sprent, J. und Webb, S.R. (1995). Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 7, 196-205. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(95\)80004-2](https://doi.org/10.1016/0952-7915(95)80004-2)

Stangl, S., Tontcheva, N., Sievert, W., Shevtsov, M., Niu, M., Schmid, T.E., Pigorsch, S., Combs, S.E., Haller, B., Balermipas, P., *et al.* (2018). Heat shock protein 70 and tumor-infiltrating NK cells as prognostic indicators for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck after radiochemotherapy: A multicentre retrospective study of the German Cancer Consortium Radiation Oncology Group (DKTK-ROG). *Int J Cancer* 142, 1911-1925. <https://doi.org/10.1002/ijc.31213>

Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., Levine, Z., Beiman, M., Dassa, L., Achdout, H., *et al.* (2009). The interaction of TIGIT with PVR

and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17858-17863. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903474106>

Steinmann, G.G. und Muller-Hermelink, H.K. (1985). [Age-related changes in the thymus-dependent immune system]. *Dtsch Med Wochenschr* 110, 1300-1307. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1069001>

Stojanovic, A. und Cerwenka, A. (2011). Natural killer cells and solid tumors. *J Innate Immun* 3, 355-364. <https://doi.org/10.1159/000325465>

Stojanovic, A., Correia, M.P. und Cerwenka, A. (2013). Shaping of NK cell responses by the tumor microenvironment. *Cancer Microenviron* 6, 135-146. <https://doi.org/10.1007/s12307-012-0125-8>

Stremmel, C., Dango, S., Thiemann, U., Kayser, G. und Passlick, B. (2007). [Thymoma--incidence, classification and therapy]. *Dtsch Med Wochenschr* 132, 2090-2095. <https://doi.org/10.1055/s-2007-985647>

Ströbel, P., Hohenberger, P. und Marx, A. (2010). Thymoma and thymic carcinoma: molecular pathology and targeted therapy. *J Thorac Oncol* 5, S286-290. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f209a8>

Sullivan, D.M., Chow, K.C., Glisson, B.S. und Ross, W.E. (1987). Role of proliferation in determining sensitivity to topoisomerase II-active chemotherapy agents. *NCI Monogr*, 73-78.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R.L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A. und Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 71, 209-249.

Sutherland, R.M. und Durand, R.E. (1976). Radiation response of multicell spheroids--an in vitro tumour model. *Curr Top Radiat Res Q* 11, 87-139.

Szablewski, L. (2013). Expression of glucose transporters in cancers. *Biochim Biophys Acta* 1835, 164-169. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.12.004>

Takahashi, R., Deveraux, Q., Tamm, I., Welsh, K., Assa-Munt, N., Salvesen, G.S. und Reed, J.C. (1998). A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases. *J Biol Chem* 273, 7787-7790. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.14.7787>

Takai, Y., Miyoshi, J., Ikeda, W. und Ogita, H. (2008). Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 603-615. <https://doi.org/10.1038/nrm2457>

Takasugi, M., Mickey, M.R. und Terasaki, P.I. (1973). Reactivity of lymphocytes from normal persons on cultured tumor cells. *Cancer Res* 33, 2898-2902.

Tennant, D.A., Duran, R.V. und Gottlieb, E. (2010). Targeting metabolic transformation for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 10, 267-277. <https://doi.org/10.1038/nrc2817>

Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N.F., Chaput, N. und Zitvogel, L. (2008). Natural killer cell-directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 9, 486-494. <https://doi.org/10.1038/ni1580>

Timonen, T., Ortaldo, J.R. und Herberman, R.B. (1981). Characteristics of human large granular lymphocytes and relationship to natural killer and K cells. *J Exp Med* 153, 569-582. <https://doi.org/10.1084/jem.153.3.569>

Timonen, T. und Saksela, E. (1980). Isolation of human NK cells by density gradient centrifugation. *J Immunol Methods* 36, 285-291. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(80\)90133-7](https://doi.org/10.1016/0022-1759(80)90133-7)

Tognarelli, S., Jacobs, B., Staiger, N. und Ullrich, E. (2016). Flow Cytometry-based Assay for the Monitoring of NK Cell Functions. *J Vis Exp*. <https://doi.org/10.3791/54615>

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581. <https://doi.org/10.1038/302575a0>

Tonegawa, S. (1988). Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 8, 3-26. <https://doi.org/10.1007/bf01128968>

Tung, J.W., Heydari, K., Tirouvanziam, R., Sahaf, B., Parks, D.R., Herzenberg, L.A. und Herzenberg, L.A. (2007). Modern flow cytometry: a practical approach. *Clin Lab Med* 27, 453-468, v. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2007.05.001>

van Engeland, M., Nieland, L.J., Ramaekers, F.C., Schutte, B. und Reutelingsperger, C.P. (1998). Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 31, 1-9. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0320\(19980101\)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0320(19980101)31:1<1::aid-cyto1>3.0.co;2-r)

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C. und Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029-1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>

Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184, 39-51. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(95\)00072-i](https://doi.org/10.1016/0022-1759(95)00072-i)

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R. und Berneman, Z.N. (2005). Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol* 84, 627-639. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1065-x>

Viel, S., Marcais, A., Guimaraes, F.S., Loftus, R., Rabilloud, J., Grau, M., Degouve, S., Djebali, S., Sanlaville, A., Charrier, E., *et al.* (2016). TGF-beta inhibits the activation

and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal* 9, ra19. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aad1884>

Vinci, M., Box, C., Zimmermann, M. und Eccles, S.A. (2013). Tumor spheroid-based migration assays for evaluation of therapeutic agents. *Methods Mol Biol* 986, 253-266. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-311-4_16

Vinci, M., Gowan, S., Boxall, F., Patterson, L., Zimmermann, M., Court, W., Lomas, C., Mendiola, M., Hardisson, D. und Eccles, S.A. (2012). Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 10, 29. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>

Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M. und Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331, 44-49. <https://doi.org/10.1126/science.1198687>

Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. und Ugolini, S. (2008). Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9, 503-510. <https://doi.org/10.1038/ni1582>

von Boehmer, H. (1994). Positive selection of lymphocytes. *Cell* 76, 219-228. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90330-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90330-1)

Vousden, K.H. und Lu, X. (2002). Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2, 594-604. <https://doi.org/10.1038/nrc864>

Wang, Y.D., Li, S.J. und Liao, J.X. (2013). Inhibition of glucose transporter 1 (GLUT1) chemosensitized head and neck cancer cells to cisplatin. *Technol Cancer Res Treat* 12, 525-535. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500343>

Weiswald, L.B., Bellet, D. und Dangles-Marie, V. (2015). Spherical cancer models in tumor biology. *Neoplasia* 17, 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2014.12.004>

Willis, S.N. und Adams, J.M. (2005). Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 17, 617-625. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2005.10.001>

Wiśniewski, J.R., Vildhede, A., Norén, A. und Artursson, P. (2016). In-depth quantitative analysis and comparison of the human hepatocyte and hepatoma cell line HepG2 proteomes. *Journal of proteomics* 136, 234-247.

Wyllie, A.H. (1997). Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 53, 451-465. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011623>

Yagi, K., Hirata, T., Fukuse, T., Yokomise, H., Inui, K., Ike, O., Mizuno, H., Aoki, M., Hitomi, S. und Wada, H. (1996). Surgical treatment for invasive thymoma, especially when the superior vena cava is invaded. *The Annals of thoracic surgery* 61, 521-524. [https://doi.org/10.1016/0003-4975\(95\)00983-3](https://doi.org/10.1016/0003-4975(95)00983-3)

Yamamoto, T., Seino, Y., Fukumoto, H., Koh, G., Yano, H., Inagaki, N., Yamada, Y., Inoue, K., Manabe, T. und Imura, H. (1990). Over-expression of facilitative glucose transporter genes in human cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 223-230. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)91263-r](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)91263-r)

Yang, Z., Schumaker, L.M., Egorin, M.J., Zuhowski, E.G., Guo, Z. und Cullen, K.J. (2006). Cisplatin preferentially binds mitochondrial DNA and voltage-dependent anion channel protein in the mitochondrial membrane of head and neck squamous cell carcinoma: possible role in apoptosis. *Clin Cancer Res* 12, 5817-5825. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1037>

Yoon, S., Kim, J.A., Lee, S.H., Kim, M. und Park, T.H. (2013). Droplet-based microfluidic system to form and separate multicellular spheroids using magnetic nanoparticles. *Lab Chip* 13, 1522-1528. <https://doi.org/10.1039/c3lc41322e>

Yu, X., Harden, K., Gonzalez, L.C., Francesco, M., Chiang, E., Irving, B., Tom, I., Ivelja, S., Refino, C.J., Clark, H., *et al.* (2009). The surface protein TIGIT suppresses T cell activation by promoting the generation of mature immunoregulatory dendritic cells. *Nat Immunol* 10, 48-57. <https://doi.org/10.1038/ni.1674>

Zanoni, M., Cortesi, M., Zamagni, A., Arienti, C., Pignatta, S. und Tesei, A. (2020). Modeling neoplastic disease with spheroids and organoids. *J Hematol Oncol* 13, 97. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00931-0>

Zembruski, N.C., Stache, V., Haefeli, W.E. und Weiss, J. (2012). 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. *Anal Biochem* 429, 79-81. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>

Zhan, M., Zhang, Z., Zhao, X., Zhang, Y., Liu, T., Lu, L. und Li, X.Y. (2022). CD155 in tumor progression and targeted therapy. *Cancer Lett* 545, 215830. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2022.215830>

Zhang, P., Mueller, S., Morais, M.C., Bator, C.M., Bowman, V.D., Hafenstein, S., Wimmer, E. und Rossmann, M.G. (2008). Crystal structure of CD155 and electron microscopic studies of its complexes with polioviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 18284-18289. <https://doi.org/10.1073/pnas.0807848105>

Zhang, Q., Bi, J., Zheng, X., Chen, Y., Wang, H., Wu, W., Wang, Z., Wu, Q., Peng, H., Wei, H., *et al.* (2018). Blockade of the checkpoint receptor TIGIT prevents NK cell exhaustion and elicits potent anti-tumor immunity. *Nat Immunol* 19, 723-732. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0132-0>

Zhou, F. (2009). Molecular mechanisms of IFN-gamma to up-regulate MHC class I antigen processing and presentation. *Int Rev Immunol* 28, 239-260. <https://doi.org/10.1080/08830180902978120>

Zimmermann, M. und Meyer, N. (2011). Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol Biol* 740, 57-63. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_8

Zinkernagel, R.M., Callahan, G.N., Klein, J. und Dennert, G. (1978). Cytotoxic T cells learn specificity for self H-2 during differentiation in the thymus. *Nature* 271, 251-253. <https://doi.org/10.1038/271251a0>

Zou, Y., Fineberg, S., Pearlman, A., Feinman, R.D. und Fine, E.J. (2020). The effect of a ketogenic diet and synergy with rapamycin in a mouse model of breast cancer. *PLoS One* 15, e0233662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233662>

Żuchowska, A., Baranowska, P., Flont, M., Brzózka, Z. und Jastrzębska, E. (2024). 3D cell models for organ-on-a-chip applications. *Analytica Chimica Acta*, 342413

8 ANHANG

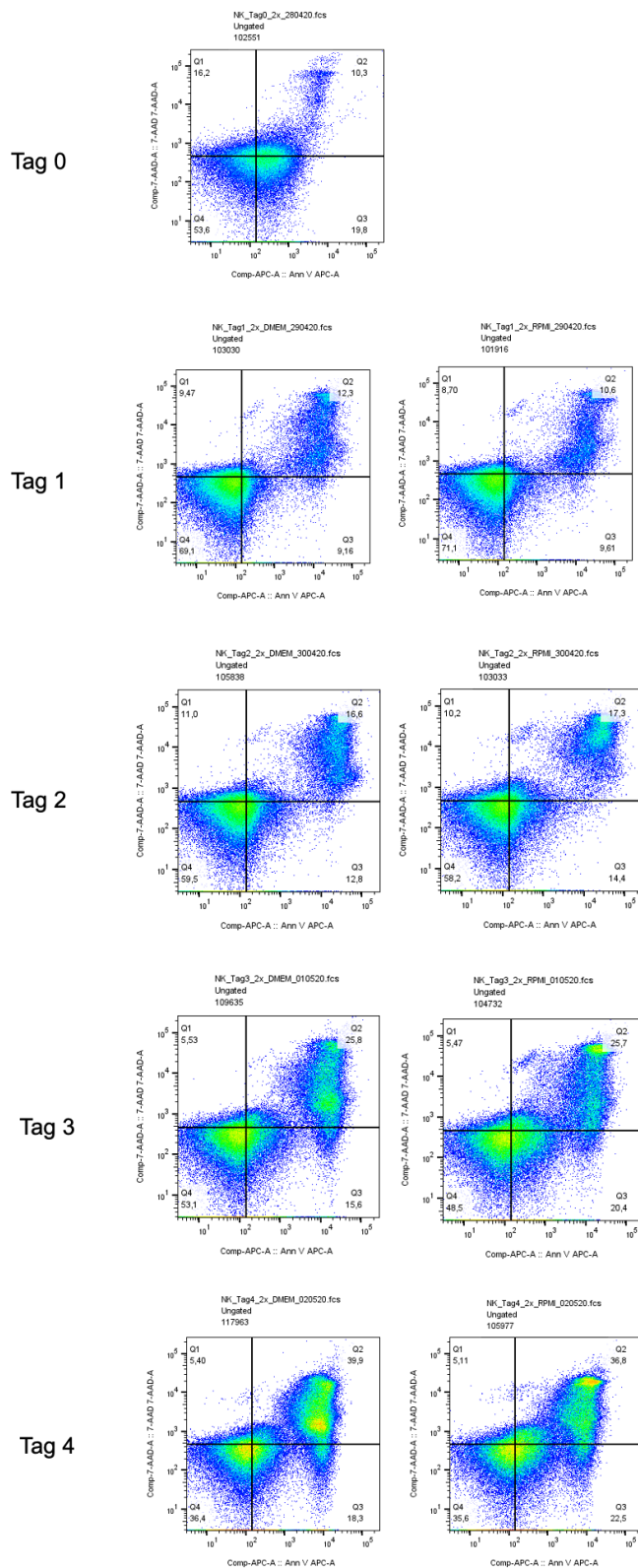


Abbildung 47: Darstellung der Vitalität von NK-Zellen in zwei verschiedenen Tumormedien. Links: TY82-Medium (DMEM), rechts: HepG2-Medium (RPMI). Die NK-Zellen wurden über einen Zeitraum von vier Tagen kultiviert, anschließend mit 7-AAD/AnnexinV gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

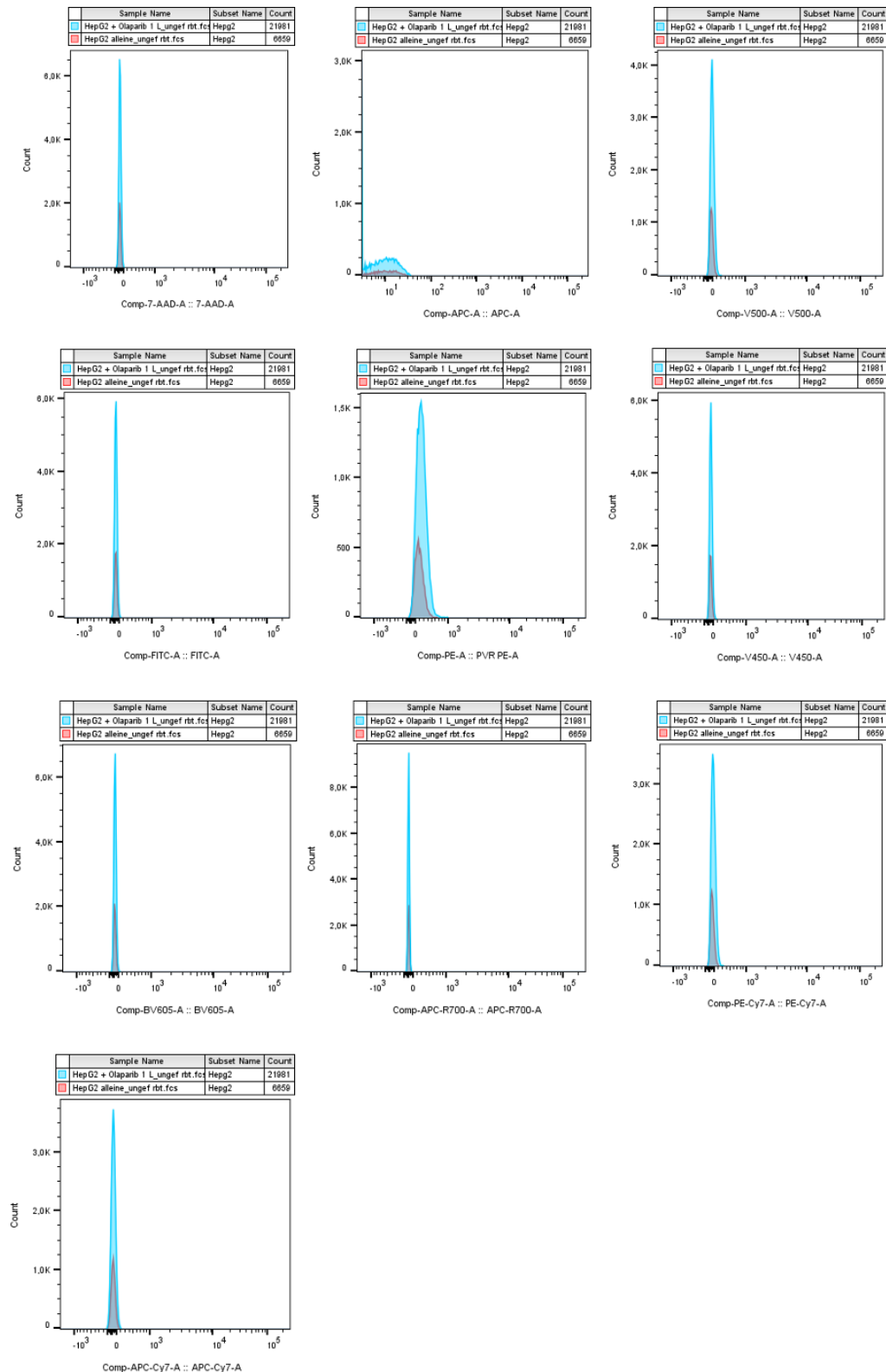


Abbildung 48: Autofluoreszenz von Olaparib. Verglichen werden HepG2-Zellen allein (rot) und HepG2-Zellen nach Olaparib-Behandlung (blau) in verschiedenen Kanälen. Es wurden 250.000 Zellen pro Well in 12-Well-Platten eingesät. 24 Stunden später wurden die Tumorzellen mit Olaparib behandelt und für 24 Stunden inkubiert. Die FACS-Auswertung erfolgte mittels eines Überlagerens der Histogramme der Abbildungen. Es ist keine Autofluoreszenz in den Kanälen APC, BV605, PE, V500, FITC, V450 und PerCP (7-AAD) zu erkennen.

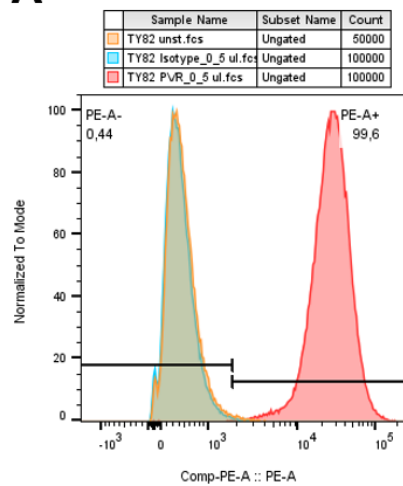
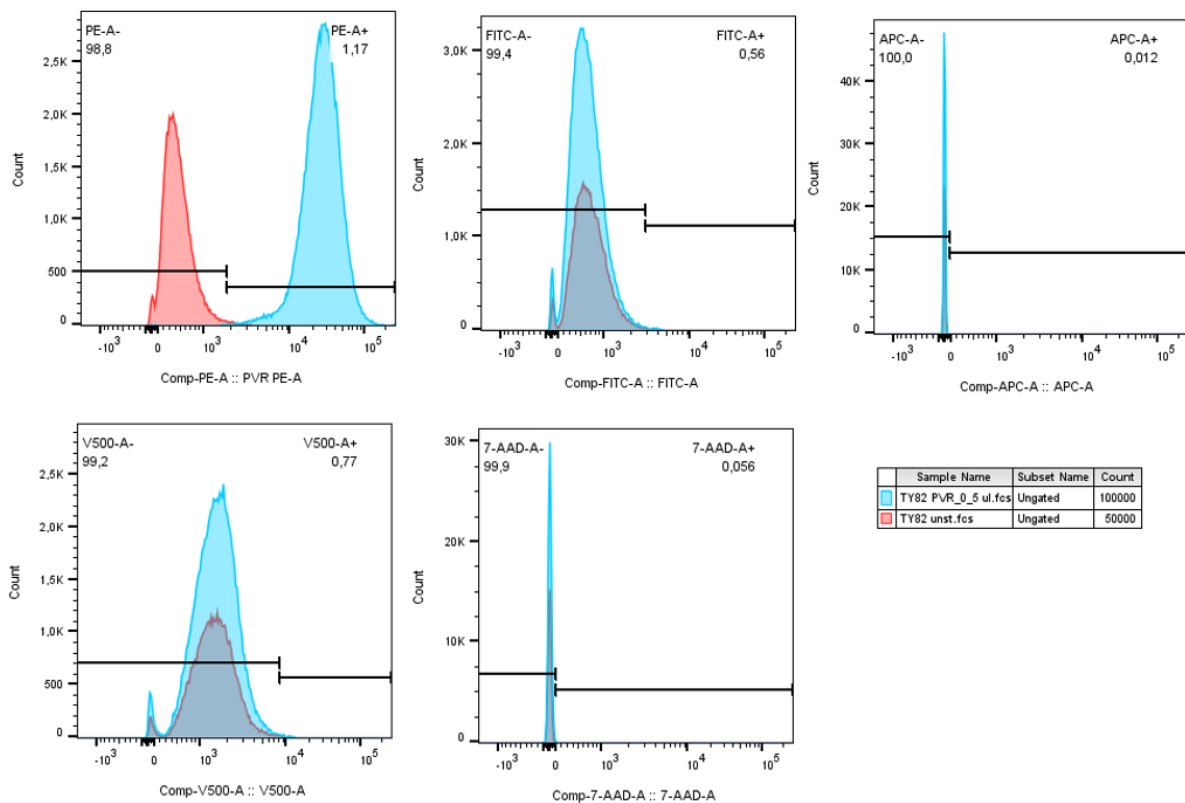
A**B**

Abbildung 49: Isotypenkontrolle und Kanalüberprüfung für CD155 bei TY82-Zellen. (A) Isotypenkontrolle bei TY82-Zellen für die CD155-Expression zeigte keine spezifische Bindung. Eine Antikörpermenge von 25 ng ist optimal, um einen ausreichenden Peak im PE-Kanal zu erreichen. Dargestellt sind ungefärbte Tumorzellen (gelb), der Isotyp (blau, 25 ng) und die CD155-Färbung (rot, 25 ng). **(B)** Überprüfung der Kanal-Reinheit für CD155-Färbungen bei TY82-Zellen. Dargestellt sind Histogramme verschiedener Fluoreszenzkanäle. Gegatet wurden die ungefärbten TY82-Zellen (rot) und die CD155 gefärbten TY82-Zellen (blau, 25 ng) in den Kanälen PE (Primärkanal), sowie PerCP, APC, FITC, V500. Es konnte keine relevante Strahlung in andere Kanäle beobachtet werden.

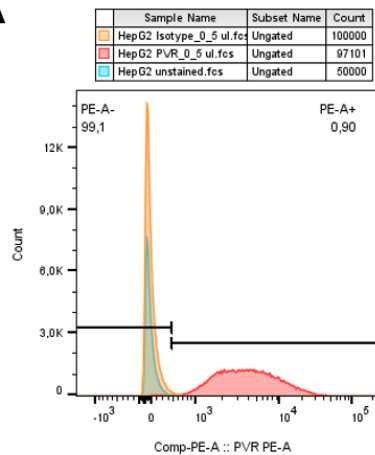
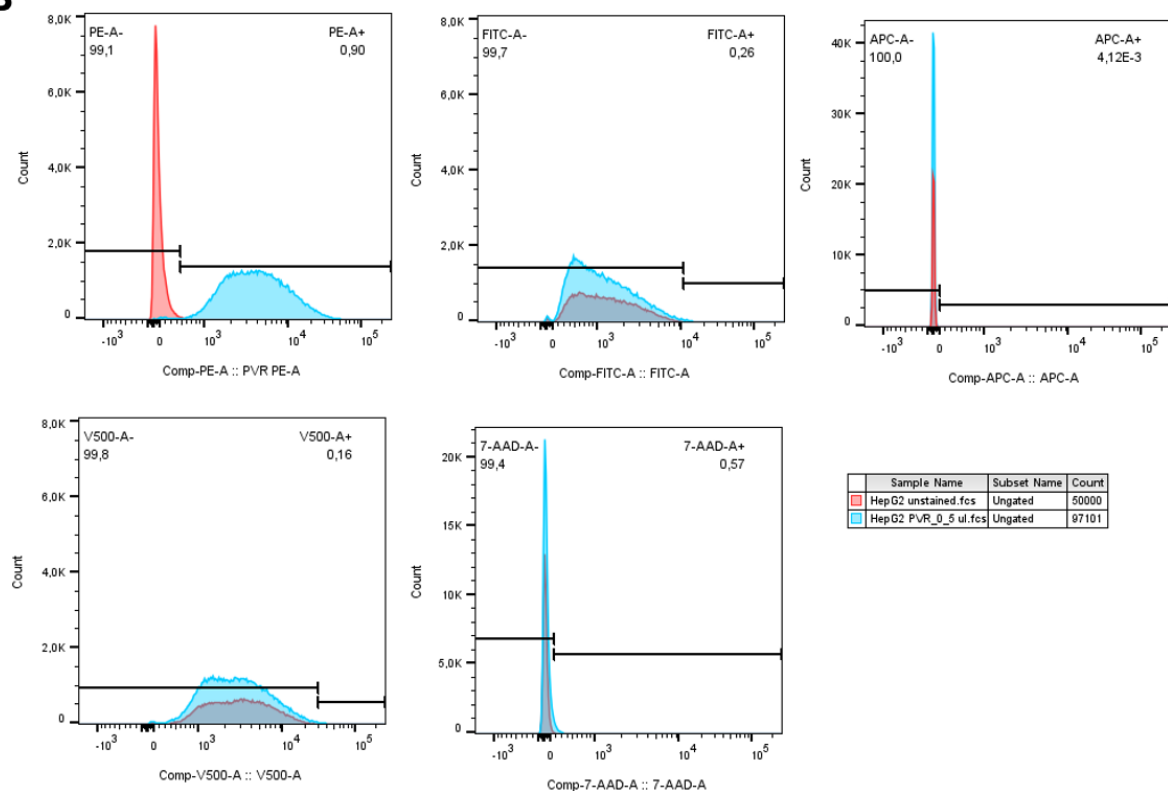
A**B**

Abbildung 50: Isotypenkontrolle und Kanalüberprüfung für CD155 bei HepG2-Zellen. (A) Isotypenkontrolle bei HepG2-Zellen für die CD155-Expression zeigte keine spezifische Bindung. Eine Antikörpermenge von 25 ng ist optimal, um einen ausreichenden Peak im PE-Kanal zu erreichen. Dargestellt sind ungefärbte Tumorzellen (gelb), der Isotyp (blau, 25 ng) und die CD155-Färbung (rot, 25 ng). **(B)** Überprüfung der Kanal-Reinheit für CD155-Färbungen bei HepG2-Zellen. Dargestellt sind Histogramme verschiedener Fluoreszenzkanäle. Gegatet wurden die ungefärbten HepG2-Zellen (rot) und die CD155 gefärbten HepG2-Zellen (blau, 25 ng) in den Kanälen PE (Primärkanal), sowie PerCP, APC, FITC, V500. Es konnte keine relevante Strahlung in andere Kanäle beobachtet werden.

9 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Kleiner Susanne Christine
Geburtsdatum: 30.05.1986
Geburtsort: Mainz
Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder
Vater: Christoph Emanuel Stief
Mutter: Gisela Stief (geb. Uhlig)

SCHULISCHER WERDEGANG

1996 – 2005 Gymnasium am Kaiserdom, Speyer.
08.03.2005 Abitur
2005- 2008 Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin
01.09.2008 Erfolgreicher Abschluss der Berufsausbildung

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2010/SS2014 Beginn des Studiums Bachelor of Science im Fach Molekulare Medizin an der Universität Ulm
22.09.2014 Bachelor of Science Molekulare Medizin
WS2014/WS2017 Beginn des Studiums Master of Science im Fach Life Science an der Universität Konstanz
Masterarbeit am Pathologiscjen Institut Uniklinikum Heidelberg mit dem Titel: *Establishment of Cervical Cancer Spheroids and Characterisation of Anti-Neoplastic Effects of Demethylating Treatment in this 3-D Tumor Model*
09.01.2017 Master of Science, Note:1,7

10 DANKSAGUNG

„Keine Schuld ist dringender, als die, Dank zu sagen.“

-Marcus Tullius Cicero-

Vielen Dank an Professor Dr. Thiel für die Möglichkeit meine Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Dr. PD Holger Lindner, der nicht nur ein hervorragender Betreuer ist, sondern ein Doktorvater, der mir wissenschaftliches Denken und Arbeiten beigebracht hat und mich vom ersten Tag an mit seiner Begeisterung und Euphorie für das Thema angesteckt hat. Danke, dass du immer an meine Fähigkeiten geglaubt hast und mir die Flexibilität gegeben hast meine beruflichen Verpflichtungen mit den Herausforderungen einer jungen Familie zu vereinbaren!

Danke an Dr. Djeda Belharazem-Vitacolonna, die mich bereits in meinem ersten Praktikum im Studium unter ihre Fittiche nahm und die Leidenschaft für die Forschung entfachte.

Ein riesengroßes Dankeschön geht besonders an Dr. Anna Coulibaly und Dr. Sonia Velásques, die mir mit ihren kreativen Ideen und ihrem Blick auf meine Arbeit immer wieder neue Perspektiven eröffnet haben und mir bei allen Problemen immer zur Seite standen und geholfen haben. Ebenfalls danke ich Eylem Baslar, Katharina Lühmann, Melanie Grassel und Tanja Fuderer für ihre große Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt Jutta Schulte, die mir mit ihrem großen Fachwissen und ihrer langjährigen Erfahrung immer zur Seite stand und für die es niemals ein „geht nicht“ gibt und für alle Widrigkeiten des Laboralltags eine Lösung gefunden hat! Eure Hilfsbereitschaft haben nicht nur meine Arbeit bereichert, sondern auch die Zeit im Labor zu einer angenehmen Zeit gemacht.

Bianca Himmelhahn, Kathrin Brohm und Noah Schäfer: Ich schätze die vielen gemeinsamen Stunden, in denen wir zusammen an Projekten gearbeitet, Herausforderungen gemeistert und Erfolge gefeiert haben.

Diese Arbeit ist nicht nur das Ergebnis meiner Anstrengungen, sondern auch der Liebe, Unterstützung und Werte, die mir meine Familie mit auf den Weg gegeben haben: Mein tiefster Dank gilt meinen Großeltern, Eltern, Patenonkel und Schwiegereltern. Ihr habt mich von Anfang an ermutigt, meinen eigenen Weg zu gehen, mich gefördert und mir immer das Gefühl gegeben, dass ich alles erreichen kann, wenn ich nur an mich glaube. Eure unendliche Fürsorge, euer Vertrauen und eure bedingungslose Liebe haben mich durch mein Leben begleitet. Ihr habt mir gezeigt, was es bedeutet, mit Hingabe und Leidenschaft für seine Ziele zu kämpfen.

Ein besonderer Dank gilt meinem großartigen Ehemann Thomas. Du warst und bist immer mein größter Unterstützer und mein sicherer Hafen. Du hast mir den Rücken freigehalten, mich immer wieder ermutigt und mich daran erinnert, warum ich diesen Weg eingeschlagen habe. Danke, dass du immer an meiner Seite bist.

An meine wunderbaren Kinder Frieda und Emil: Ihr habt mich mit euren fröhlichen Wesen und eurer bedingungslosen Liebe immer wieder daran erinnert, worauf es wirklich im Leben ankommt. Ihr seid mein größtes Glück und meine größte Motivation. Diese Dissertation widme ich meiner Familie: meinem Zuhause, meiner größten Inspiration. Von Herzen: Danke.