

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
Prof. Dr. O. Ortman
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss einer Anthracyclin- und Taxanbehandlung auf die
immunologische Tumorabwehr unter Antikörpertherapie**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Turinsky

2020

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR FRAUENHEILKUNDE UND GEBURTSHILFE
Prof. Dr. O. Ortman
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

**Einfluss einer Anthracyclin- und Taxanbehandlung auf die
immunologische Tumorabwehr unter Antikörpertherapie**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Lisa Turinsky

2020

Dekan: Prof. Dr. Dipl.-Phys. Dirk Hellwig
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Anja-Kathrin Wege
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Hehlhans
Tag der mündlichen Prüfung: 10.06.2020

Meiner Mutter Brigitte

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Tumorimmunologie	1
1.2. Anti-Tumor-Immunantwort	2
1.3. NK-Zellen	2
1.3.1. Rezeptorrepertoire der NK-Zellen	4
1.3.2. Zytokinrepertoire der NK-Zellen	7
1.4. Tumorantigene	8
1.4.1. Tumorantigene mit hoher Tumorspezifität	8
1.4.2. Tumorantigene mit niedriger Tumorspezifität	9
1.4.3. Das tumorassoziierte Antigen Her2/neu	9
1.5. Trastuzumab-Therapie	11
1.5.1. Wirkung	11
1.5.2. Nebenwirkungen	13
1.6. (Neo-)Adjuvante Chemotherapie	13
1.6.1. Taxane	14
1.6.2. Anthracycline	15
1.7. Effekte von Chemotherapie auf die Anti-Tumor-Immunantwort	17
1.7.1. Immunsuppression vs. Immunmodulierung	17
1.7.2. Tolerogener vs. immunogener Zelltod	18
2. Zielsetzung	20
3. Material und Methoden	21
3.1. Zelllinien	21
3.1.1. Targetzellen	21
3.1.2. Effektorzellen	21
3.2. Therapeutika	22
3.2.1. Trastuzumab	22
3.2.2. Epirubicin und Paclitaxel	22
3.3. Materialien	22
3.4. Theoretische Grundlagen	26
3.4.1. Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik	26
3.4.2. Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie	31
3.4.3. Apoptose-Analyse mittels Durchflusszytometrie	32
3.4.4. Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie	33
3.5. Methoden der Zellkultur und -präparation	35

3.5.1.	Standardkultur	35
3.5.2.	Vorversuche in Monokultur	36
3.5.3.	Versuche in Kokultur	38
3.5.4.	Versuche mit NK3.3 als Effektorzellen	39
3.5.5.	Versuche mit MNC als Effektorzellen	42
3.5.6.	Differentielle Proteinexpressionsanalyse	46
4.	Ergebnisse	48
4.1.	Vorversuche zur Definition der Anthracyclin-/Taxan-Konzentration	48
4.2.	Kokultur-Versuche mit NK3.3 als Effektorzellen	52
4.2.1.	1:1 Kokultur mit BT-474	52
4.2.2.	5:1 Kokultur mit BT-474	55
4.2.3.	Alternative Targetzellen	57
4.2.4.	Phänotyp der NK-Zellen	60
4.2.5.	Perforin- und IFN- γ -Produktion der NK-Zellen	63
4.2.6.	Proteinexpression der NK-Zellen	65
4.3.	Kokultur-Versuche mit CBMC als Effektorzellen	69
4.3.1.	Typisierung der CBMC	69
4.3.2.	Phänotypisierung der cord blood-derived NK-Zellen	70
4.3.3.	Direkte und indirekte Killing-Aktivität der CBMC	71
5.	Diskussion	74
5.1.	Einfluss der Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität	74
5.1.1.	Her2 ⁺ , Herceptin-sensibles Kokultur-Modell	74
5.1.2.	Variation der Effektor:Target Ratio	77
5.1.3.	Variation der Targetzellen	77
5.1.4.	Variation der Effektorzellen	79
5.2.	Effekte der Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die antitumorale NK-Zell-Antwort	80
5.2.1.	Effekte auf Tumorzellebene	81
5.2.2.	Effekte auf NK-Zellebene	83
6.	Zusammenfassung	93
7.	Literaturverzeichnis	95
	Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
ACD	accidental cell death
Abb.	Abbildung
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
Ag	Antigen
AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
BC	breast cancer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium
CB	cord blood
CBMC	cord blood(-derived) mononuclear cells
CC	cellular cytotoxicity
CD	cluster of differentiation
CDC	complement-dependent cytotoxicity
CDCC	complement-dependent cellular cytotoxicity
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	day
d. h.	das heißt
DAMP	damage-/danger-associated molecular pattern
DC	dendritic cell
DNA	deoxyribonucleic acid
ErbB2	erb-B2 receptor tyrosine kinase 2
et al.	und andere
E:T	effector to target cell ratio
FACS	fluorescence-activated cell sorting/scanning
FcγR	Fcγ receptor
FSC	forward scatter
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
h	hour

Her2	human epidermal growth factor receptor 2
HLA	human leucocyte antigen
i. A.	im Allgemeinen
i. d. R.	in der Regel
i. R.	im Rahmen
ICD	immunogenic cell death
IgG1 κ	Immunglobulin G1 κ
IL	Interleukin
insb.	insbesondere
inkl.	inklusive
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
m ²	Quadratmeter
MACS	magnetic cell separation
max.	maximal
MFI	mean fluorescence intensity
mg	Milligramm
MHC	major histocompatibility complex
min	minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm ³	Kubikmillimeter
MNC	mononuclear cell
n	Anzahl
nm	Nanometer
O ₂	Sauerstoff
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PB	peripheral blood
PCD	programmed cell death
PPR	pattern-recognition receptor
resp.	respektive
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
s	second
SI	stain index
sog.	sogenannt(e)
SSC	side scatter
Tab.	Tabelle

u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
zw.	zwischen

1. Einleitung

1.1. Tumormimmunologie

Schon vor über 100 Jahren spekulierte Ehrlich über „Schutzvorrichtungen“ des Immunsystems, ohne die der Körper vermutlich von Tumoren überwuchert würde¹. Burnet konkretisierte diese These gegen Ende der 1950er-Jahre, indem er die Theorie der (*Tumor-*)*Immunüberwachung* formulierte, nach der die Immunzellen über den Körper wachen, um entartete Zellen zu eliminieren². Die erste Evidenz einer Immunisierung gegen Tumoren im Tiermodell hatten Gross (1943), Foley (1953) und Prehn (1957) geliefert³⁻⁵. Einem weitreichenden Erkenntnisgewinn ebnete aber erst die Entdeckung humaner Tumorantigene in den 1990er-Jahren den Weg⁶⁻⁸. Auf Basis dieser Erkenntnisse griffen Dunn et al. (2004) die Theorie der (*Tumor-*)*Immunüberwachung* knapp 50 Jahre nach ihrer Entstehung erneut auf und integrierten sie in den Kontext eines komplexeren Konzepts: dem der (*Tumor-*)*Immuneditierung*. Nach diesem Konzept vollzieht sich die Anti-Tumor-Immunantwort in drei Schritten – den drei „E“s (vgl. Abb. 1)⁹: Die Immunzellen versuchen die Tumorzellen zu eliminieren, es resultiert ein Tumorregress. Gleichzeitig üben sie hierdurch aber auch einen Selektionsdruck aus, der tolerogene Tumorzellklone bevorzugen kann. Gelingt es den Immunzellen nämlich nicht die Tumorzellen zu eliminieren (*1. Elimination*), entsteht zwischenzeitig ein Gleichgewicht (*2. Equilibrium*) bis sich letztlich ein selektierter Klon der Immunkontrolle entzieht und ungehindert proliferiert (*3. Escape*). Ein Tumorprogress ist die Folge. *Tumor-Immuneditierung* fokussiert folglich – anders als *Tumor-Immunüberwachung* – nicht nur die protektive Rolle des Immunsystems, sondern spiegelt die widerstreitende Wechselwirkung zwischen Tumor- und Immunsystem wider.

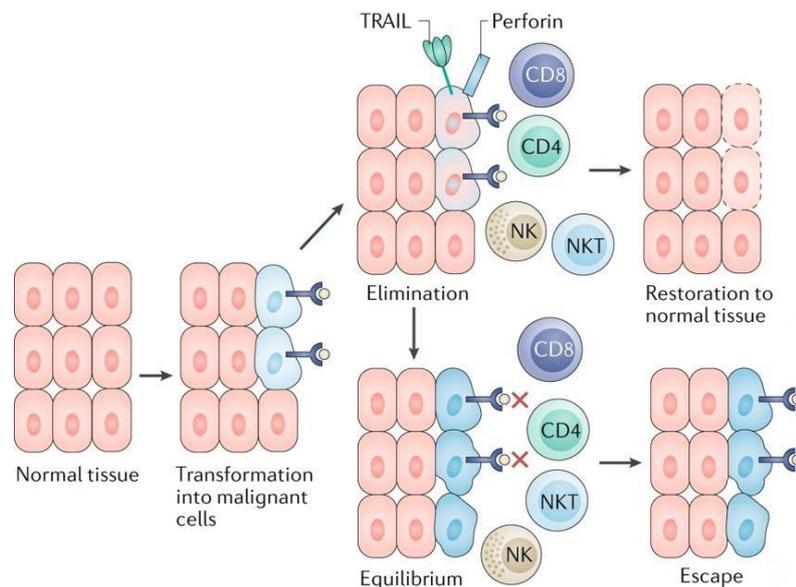


Abbildung 1: Tumor-Immuneditierung mit seinen drei „E“s: 1. Elimination, 2. Equilibrium und 3. Escape. [modifiziert nach Sury et al.¹⁰] Im Idealfall werden entartete Zellen von den Zellen der angeborenen (NK-Zellen und NKT-Zellen) und adaptiven Abwehr (CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen) erkannt und erfolgreich eliminiert (*Elimination* → *Restoration*). Gelingt die Elimination aber nicht, entkommen v. a. tolerogene Tumorzellen. Denn unter dem Druck der Immunzellen setzen sich insb. diejenigen Klone durch, die sich deren Kontrolle entziehen konnten (*Equilibrium* → *Escape*).

1.2. Anti-Tumor-Immunantwort

In der Immunüberwachung eigener, entarteter Zellen kooperieren (wie auch bei anderen Krankheiten) angeborene und adaptive Immunabwehr, um eine humorale und zelluläre Anti-Tumor-Antwort zu initiieren.

Die Zellen der *angeborenen Abwehr* (u. a. Granulozyten und Makrophagen) stellen die schnelle Vorhut des Immunsystems. Anders als die Zellen der *adaptiven Abwehr* (v. a. B-, CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen), die erst nach Antigenkontakt aktiviert werden (*Priming*), um zu kompetenten, auf ebendieses Antigen abgerichteten Effektorzellen zu differenzieren, sind sie gefordert umgehend zu intervenieren. Statt nach spezifischen Antigenen fahnden sie deshalb via nicht-klonaler, keimbahnkodierter Rezeptoren, v. a. mittels Mustererkennungsrezeptoren – *pattern-recognition receptors PRRs* –, nach einem Set breit exprimierter, hoch konservierter Molekülmuster, den

- *pathogen-associated molecular patterns PAMPs*,
die infektiöse Eindringlinge enttarnen (*infectious non-self model* nach Janeway¹¹) bzw. den
- *damage/danger-associated molecular patterns DAMPs*,
die (auch) nicht-infektiöse Bedrohungen im Inneren anzeigen (*danger model* nach Matzinger¹²).

Nach der *Danger-* oder *Damage-Theorie* werden DAMPs von gestressten Zellen wie z. B. Tumorzellen exprimiert bzw. emittiert. Diese Gefahrensignale locken dendritische Zellen (*dendritic cells DCs*) an. Die DCs, die der angeborenen Abwehr angehören, agieren als professionelle Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells APCs*). Sie phagozytieren z. B. zugrunde gehende Tumorzellen und prozessieren deren tumorassoziierte Antigene, um sie MHC-II/I-restringiert CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu unterbreiten, die der adaptiven Abwehr angehören^A. Letztere können – wenn aktiviert – eine zielgerichtete Anti-Tumor-Antwort gegen die Tumorantigene generieren. Direkt können die Tumorzellen bzw. deren Tumorantigene dagegen häufig keine adäquate, adaptive Anti-Tumor-Antwort primen, da die Tumorantigene *entweder* nicht immunogen genug sind *oder* aber immunogen genug wären, den zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen jedoch nicht (hinreichend) im Kontext von MHC-I-Molekülen unterbreitet werden. Denn entartete (wie auch virusinfizierte) Zellen können, um dem Immunsystem zu entgehen, ihre HLA-I-Antigene herunterregulieren. Eine Zelle der angeborenen Abwehr, die Natürliche Killer (NK)-Zelle, hat deren Taktik jedoch zu ihrer eigenen verkehrt: Sie sucht ihre Zielzellen explizit nach MHC-I-Molekülen ab und kann MHC-I-defiziente Zellen direkt angreifen (*missing self-hypothesis* nach Kärre).

1.3. NK-Zellen

Diese Fertigkeit der NK-Zellen, anders als die Zellen der adaptiven Abwehr ohne vorherige Sensibilisierung töten zu können, führte auch zu ihrer Entdeckung. Nachdem man *natural killing* (von mit Immunzellen konfrontierten Tumorzellen) anfangs noch als *background activity* oder *artefact* abgetan hatte, kam man in

^A Mittels der MHC-Moleküle (*major histocompatibility complex*), alternativ auch HLA-Antigene (*human leukocyte antigen*) genannt, werden T-Zellen Peptide präsentiert. Über MHC-Klasse-I-Moleküle, die alle kernhaltigen Zellen exprimieren, werden CD8⁺ T-Zellen dabei Fragmente intrazellulärer Peptide dargeboten. Via der MHC-Klasse-II-Moleküle, mit denen lediglich die professionellen Antigen-präsentierenden Zellen ausgestattet sind, werden CD4⁺ T-Zellen dagegen die Fragmente endozytierter Peptide unterbreitet.

den 1970er-Jahren allmählich den *natural killer (NK) cells* auf die Schliche – u. a. auch unabhängig voneinander Herberman (National Cancer Institute, Bethesda) und Kiessling (Karolinska-Institut, Stockholm). Letzterer experimentierte mit einer murinen Tumorzelllinie, bei der dieses „Hintergrundproblem“ besonders störte, weswegen er eine (noch) unentdeckte Immunzelllinie vermutete. Saksela und Timonen konnten das Phänomen *natural killing* 1979 schließlich tatsächlich einem Subset großer granulierter Lymphozyten, den *natural killer cells*, attribuieren¹³, die heute nicht mehr morphologisch, sondern spezifischer über ihr CD-Expressionsprofil diskriminiert werden: klassischerweise als CD3⁻ CD56⁺ (\pm CD16⁺) Zellen. **CD3**, Teil des T-Zellrezeptors, dient dabei v. a. der Abgrenzung der NK-Zellen gegenüber T-Zellen, im Wesentlichen gegenüber NKT-Zellen, denn diese überschneiden sich mit NK-Zellen z. T. in ihrem CD-Expressionsprofil (CD56⁺, CD16⁺)¹⁴. **CD56** ist indes klassischer NK-Zell-Marker, jedoch nicht sehr spezifisch. Neben Neuronen exprimieren es u. a. auch aktivierte CD8⁺ ($\alpha\beta$ -) T-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen und DCs. Es scheint in die NK-Zell-Reifung, in deren Motilität und Migration involviert, wenn auch dessen konkrete Funktionen auf NK-Zellen noch nicht endgültig ergründet werden konnten (vgl. auch Kap. 3.4.4.)¹⁵. Die Bedeutung von **CD16** (*Fc γ receptor IIIA Fc γ RIIIA*), dem zweiten charakteristischen Antigen der NK-Zellen, ist dagegen bereits besser aufgearbeitet. Es vermittelt die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC*, vgl. auch Kapitel 1.3.1.2.).

Aufgrund der differentiellen Expression dieser beiden CD-Antigene, CD56 und CD16, werden die NK-Zellen weiter in zwei Untergruppen unterteilt, denen individuelle funktionelle Kompetenzen zugeschrieben und die auch als sequentielle Reifungsstufen verstanden werden¹⁶:

- NK-Zellen mit hoher CD56-, aber niedriger CD16-Expression: **CD56^{bright} CD16^{dim}** und
- NK-Zellen mit niedriger CD56-, aber hoher CD16-Expression: **CD56^{dim} CD16^{bright}**.

Die beiden Untergruppen unterscheiden sich in ihrem Rezeptorrepertoire, ihrer Funktion und ihrer Verteilung. CD56^{bright} CD16^{dim} NK-Zellen stellen nur ≤ 10 % der zirkulierenden NK-Zellen, überwiegen jedoch in den Lymphknoten (≥ 90 %) ^{16,17}. Dies spiegelt sich in der differentiellen Expression von L-Selektin (CD62L), einem *Homing-Rezeptor*^B, und den Chemokinrezeptoren CCR7^{high} und CXCR4^{high} wieder, die Lymphozyten zu den Lymphknoten lenken¹⁹. Denn diese finden sich v. a. auf den CD56^{bright} CD16^{dim} NK-Zellen. Sie sind die potenteren Zytokinproduzenten, weswegen ihnen v. a. eine immunregulierende Funktion attribuiert wird – u. a. auch durch die Rekrutierung anderer Immunzellen^{16,20}. Im peripheren Blut dominieren hingegen die CD56^{dim} CD16^{bright} NK-Zellen mit ≥ 90 %, die i. R. von Infektionen über ihre Chemokinrezeptoren CXCR1^{high} oder CX₃CR1^{high} vorwiegend zu den Entzündungsherden rekrutiert werden^{16,19}. Sie zeigen eine höhere direkte wie auch indirekte, antikörperabhängige zytotoxische Potenz (ADCC), jedoch eine geringere Zytokinproduktion verglichen mit den CD56^{bright} CD16^{dim} NK-Zellen^{16,20}.

^B L-Selektin (CD62L) vermittelt die Anheftung zirkulierender Lymphozyten an hochendotheliale Venolen (HEV), über die sie in lymphatisches Gewebe gelangen¹⁸.

1.3.1. Rezeptorrepertoire der NK-Zellen

Anders als die Zellen der adaptiven Abwehr, die B- und T-Zellen, verfügen die NK-Zellen nicht über *einen Antigen-spezifischen Rezeptor*, den T- oder B-Zell-Rezeptor, sondern sind mit einem *Repertoire von Rezeptoren* versehen. Dieses Repertoire bilanziert die Aktivität der NK-Zelle, d. h. erst die Nettosumme stimulierender und inhibierender Rezeptorimpulse entscheidet, ob die NK-Zelle eingreift (vgl. Abb. 2). I. d. R. überwiegen die inhibitorischen Impulse (Toleranz), die aber durch aktivierende Impulse überschrieben werden können. Eine Reihe dieser für die Zielzell-Erkennung und -Eliminierung entscheidenden, aktivierenden wie auch inaktivierenden Rezeptoren werden im Folgenden näher erläutert (vgl. Abb. 3).

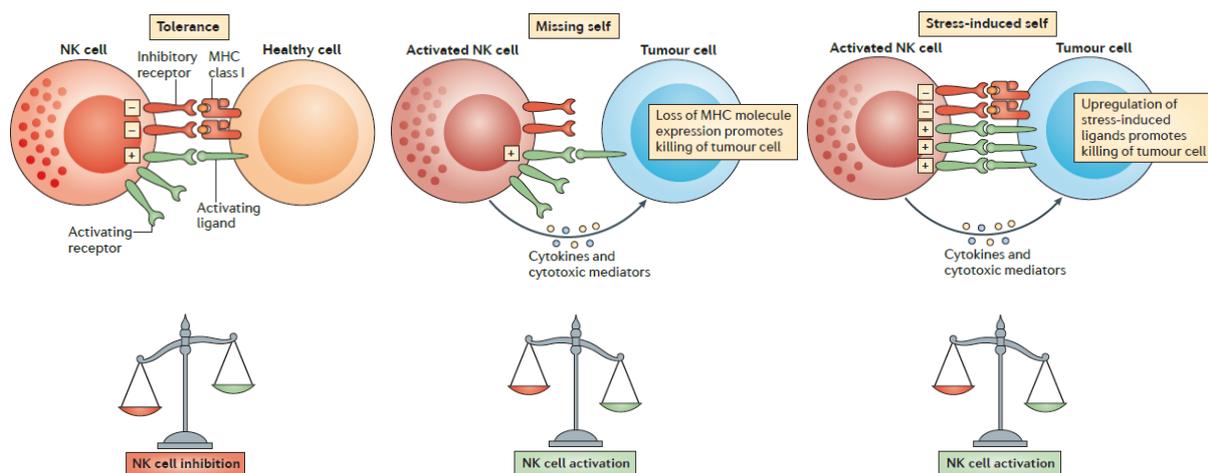


Abbildung 2: Regulation der NK-Zell-Aktivität. [modifiziert nach Vivier et al.²¹] NK-Zellen, die sich mit gesunden Zellen konfrontiert sehen, tolerieren diese, da deren Interaktion v. a. inaktivierende Rezeptoren involviert (links). Aktiviert werden NK-Zellen erst durch einen in Summe stimulierenden Rezeptorimpuls. Dieser kann aus einem „Minus“ an inaktivierenden oder einem „Plus“ an aktivierenden Signalen resultieren. Tumorzellen, die ihre MHC-I-Moleküle herunterreguliert haben (*missing self*, mittig), senden z. B. weniger inaktivierende, solche die stress-induziert MHC-I-ähnliche Liganden heraufreguliert haben (*stress-induced self*, rechts) mehr aktivierende Signale an die NK-Zelle aus. In beiden Fällen wird die NK-Zelle „enthemmt“ und greift infolge ihre Zielzellen an.

1.3.1.1. Inhibierende Rezeptoren

Selbst-MHC-I-spezifische Rezeptoren und „missing self“-Hypothese

Eine Schlüsselrolle kommt den *selbst-MHC-I-spezifischen Rezeptoren* zu, mittels derer die NK-Zellen ihre Zielzellen auf MHC-I-Moleküle screenen, um derart entartete (oder von Viren infizierte) nicht-MHC-I-exprimierende von gesunden MHC-I-exprimierenden Zellen abzugrenzen (*missing self-hypothesis*)^{22,23}. Um körpereigene Zellen tolerieren zu können, müsse – so wurde gefolgert – die NK-Zelle über mindestens einen inhibierenden selbst-MHC-I-spezifischen Rezeptor verfügen²⁴.

Entgegen der anfänglichen Annahme exprimieren jedoch einige NK-Zellen keinen solchen selbst-MHC-I-spezifischen Rezeptor. Paradoxerweise agieren diese NK-Zellen aber nicht wie anzunehmen wäre hyper- oder auto-reaktiv, sondern hypo-responsiv, wenn sie sich mit MHC-I-defizienten Zielzellen konfrontiert sehen (*hyporesponsiveness*). Dem liegt eine Lizenzierung der NK-Zellen zugrunde: Nur NK-Zellen, die über einen selbst-MHC-I-spezifischen Rezeptor verfügen, reifen zu funktionell kompetenten NK-Zellen (*NK cell licensing*). NK-Zellen, denen dieser Rezeptor fehlt, werden dagegen entweder nicht bewaffnet (*arming model*) oder entwaffnet, d. h. anerg (*disarming model*).²⁵

Sehr viele der *selbst-MHC-I-spezifischen Rezeptoren* gehören der Gruppe der *killer-cell immunoglobulin-like receptors KIRs* an, die über ihre extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen insb. die klassischen Klasse-Ia-HLAs A, B, C detektieren²⁶. Die Bindungsaffinität der inaktivierenden KIRs (mit längerer intrazellulärer Domäne mit *immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif ITIM*) scheint dabei höher als die der aktivierenden (mit kürzerer intrazellulärer Domäne, an die der *immunoreceptor tyrosine-based activation motif ITAM*-tragende Adapter DAP12 andockt)^{26,27}. Ähnlich überprüfen auch die *leukocyte immunoglobulin-like receptors LIRs* ihr Target auf HLA-Antigene²⁸.

Neben den KIRs und LIRs nutzen die NK-Zellen die *C-type lectin-like receptors CTLRs*, die v. a. das nicht-klassische HLA-E auf den Zielzellen erkennen. Nahezu alle CTLRs dimerisieren mit CD94 als invariantem Co-Rezeptor zu inhibierenden (CD94/NKG2-A und -B), aber auch aktivierenden *Heterodimeren* (CD94/NKG2-C, -E und -H) – außer NKG2D²⁹.

1.3.1.2. Aktivierende Rezeptoren

Stress-sensitiver Rezeptor NKG2D und „stress-induced self“-Hypothese

Der *homodimerisierende* NKG2D, der über die Wechselwirkung mit dem Adapterprotein DAP10 aktivierend wirkt, erkennt auch – anders als die anderen NKG2-Rezeptoren – nicht die konstitutiv exprimierten *MHC class I proteins*, sondern die erst stress-induzierten *MHC class I chain-related proteins* (sog. *induced-self antigens*), die u. a. von entarteten Zellen exprimiert werden: *MHC class I polypeptide-related sequences MICs* (MICA und -B) und *UL16 binding proteins ULBPs* (ULBP1-6)³⁰. Um die Anti-Tumor-Antwort der NK-Zellen zu unterlaufen, zielen entartete Zellen daher darauf ab, ihrerseits ebendiese induced-self Moleküle zu unterdrücken: durch epigenetische Repression der Expression (Histondeacetylase-abhängige Hypoacetylierung), durch Zytokin-induzierte Downregulierung (TGF- β) oder durch Shedding der MICs (Matrix-Metalloproteinase-abhängige Proteolyse)³¹. Denn die Liganden-Rezeptor-Bindung triggert eine Zielzellzytolyse. Eine NKG2D-Defizienz hat dagegen eine unzulängliche Tumor-Immunüberwachung durch die NK-Zellen zur Folge³².

Natürliche Zytotoxizitäts-Rezeptoren und „danger model“

Analog ist auch nach Knockout eines einzelnen *natural cytotoxicity receptors NCRs* die Eliminierung von Tumorzellen *in vitro* wie *in vivo* im Tiermodell kompromittiert³³. Denn den (überwiegend) aktivierenden natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren, zu denen NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80 zählen, wird – wie ihr Name impliziert – eine essentielle Rolle i. R. der Zielzelltötung zugeschrieben. Die Effizienz des NK-Zell-vermittelten Tumorzellkillings konnte bereits mit der NKp44- und NKp46-Expression korreliert werden. Außer NKp44, der erst nach Aktivierung auf der NK-Zelle auftaucht, werden die übrigen drei Rezeptoren konstitutiv exprimiert, wobei NKp46 am spezifischsten für NK-Zellen ist. Auch aufgrund der evolutionären Konservierung über Artgrenzen hinweg (humaner NKp46 = muriner NCR1), wird NKp46 als elementar für die Zielzellerkennung und -eliminierung erachtet.³⁴

Wie NCRs ihre Zielzellen erkennen, konnte hingegen noch nicht hinlänglich nachvollzogen werden, v. a. auch da erst einige ihrer Liganden identifiziert werden konnten (B7-H6, BAG6, MLL5, PCNA und HSPGs). Bei diesen könnte es sich um *damage-associated molecular patterns* handeln, die erst durch Stress induziert

werden. Die NCRs wären dann als *damage-associated molecular pattern recognition receptors* zu interpretieren.³⁵

Fcγ-Rezeptor IIIA und „antibody-dependent cellular cytotoxicity“

Die Funktion des Fcγ-Rezeptors IIIA (FcγRIIIA = CD16) ist demgegenüber besser ergründet. Er vermittelt eine essentielle Effektorfunktion der NK-Zellen, die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC*). Denn FcγRIIIA ist ein aktivierender Rezeptor für Fc-Fragmente von IgG-Antikörpern. Über FcγRIIIA kann die NK-Zelle an das konstante, kristallisierbare Fc-Fragment eines Antigen-gebundenen (u. a. auch therapeutischen) Antikörpers binden und so eine opsonierte Zielzelle attackieren. Auch andere Zellen der angeborenen Abwehr verfügen über Fcγ-Rezeptoren, werden aber durch ein Gleichgewicht aktivierender (FcγRIIIA) und inhibierender Fcγ-Rezeptoren (FcγRIIB) reguliert. NK-Zellen hingegen koexprimieren keinen inhibitorischen Rezeptor, weswegen sie auch als die wichtigsten ADCC-Akteure gelten.³⁶

Aufgrund eines Einzelnukleotid-Polymorphismus (*single nucleotide polymorphism SNP*: Thymin T → Guanin G) existieren zwei f, die in ihrer Affinität für die Fc-Region von IgG1 divergieren: FcγRIIIA mit Valin (V) oder Phenylalanin (Phe/F) an Position 158. NK-Zellen, die homozygot für FcγRIIIA 158 V (V/V) sind, binden affiner an IgG1 als NK-Zellen, die homozygot für FcγRIIIA 158 F (F/F) sind. Zwei Studien deuten darauf hin, dass Individuen, die sich homozygot für V zeigen (FcγRIIIA 158 V/V), auch besser auf Anti-Her2-Antikörpertherapien (Trastuzumab) ansprechen als Individuen, die sich entweder heterozygot (FcγRIIIA 158 V/F) oder homozygot für F zeigen (FcγRIIIA 158 F/F; in einer der beiden Studien deutlicher [statistisch signifikant] als in der anderen [statistisch nicht signifikanter Trend]). Eine dritte Studie (mit mehr Power) konnte dies dagegen nicht stützen.³⁷

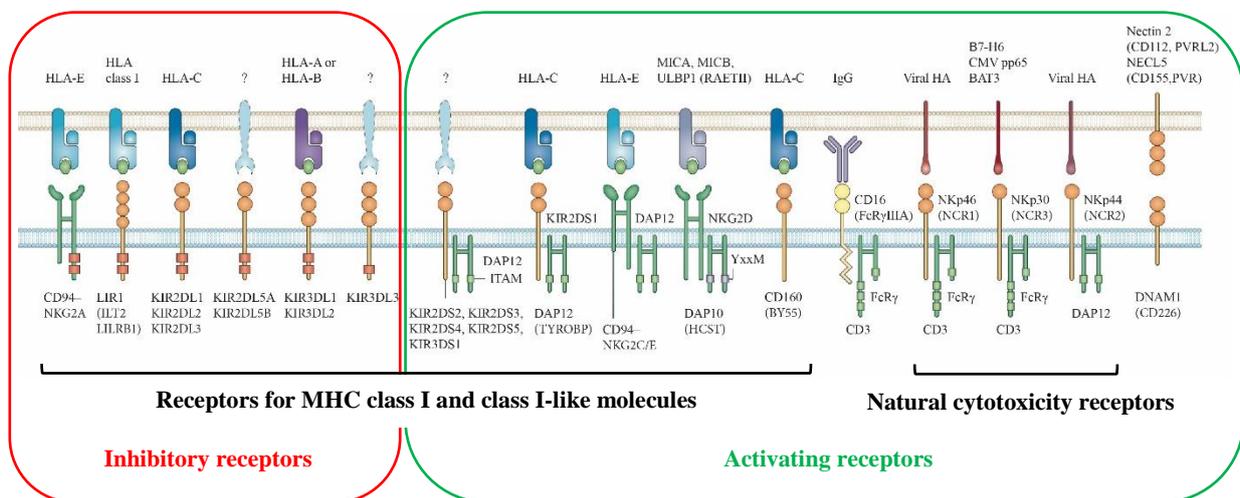


Abbildung 3: Rezeptorrepertoire der NK-Zellen (key receptors). [modifiziert nach Vivier et Ugolini³⁸] Die Aktivität der NK-Zellen wird durch inhibierende wie aktivierende Rezeptoren reguliert. Die MHC-I-spezifischen Rezeptoren (*killer-cell immunoglobulin-like receptors KIRs*, *leukocyte immunoglobulin-like receptors LIRs* und *C-type lectin-like receptors CTLRs*) inhibieren die NK-Zelle i. d. R., einige stimulieren sie aber auch – wie der MHC-I-like Moleküle erkennende Rezeptor NKG2D. Daneben wirken v. a. die natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptoren (*natural cytotoxicity receptors NCRs*), der Fcγ-Rezeptor IIIA (FcγRIIIA/CD16) und der Rezeptor DNAM-1 aktivierend.

1.3.2. Zytokinrepertoire der NK-Zellen

1.3.2.1. Zytotoxische Aktivität der NK-Zellen

Aktivierte NK-Zellen können ihr Target direkt oder indirekt Antikörper-vermittelt (ADCC) – wie soeben beschrieben – attackieren. Dessen gezielte Tötung erwirken sie *vorrangig* durch Exozytose lytischer Enzyme oder *nachrangig* über Todesrezeptoren.

Um in Interaktion treten zu können, muss die NK-Zelle an die verdächtige Zelle andocken. Diese Adhäsion vermitteln von NK-Zellen exprimierte Integrine, v. a. *lymphocyte function-associated antigen 1 LFA1* und *macrophage-1 antigen MAC1*. Zeitgleich werden aktivierende, aber auch inhibierende Rezeptoren der NK-Zelle rekrutiert und in der Kontaktzone konzentriert, wo sie ggf. vorhandene Liganden auf der Zielzelle erkennen. Resultiert ein in Summe aktivierendes Signal, stabilisiert sich die sog. *NK cell immunologic synapse NKIS*. Über eine Umstrukturierung des Zytoskeletts werden u. a. die lytischen Granula zur Bindungsstelle hin bewegt. Im Falle der NK-Zell-Aktivierung werden sie in den „synaptischen Spalt“ entleert oder Todesrezeptoren auf den Zielzellen aktiviert. Indem die Interaktion von NK- und Targetzelle auf eine definierte Zone begrenzt bleibt, werden umgebende, gesunde Zellen verschont.³⁹

In den gerade genannten Granula halten die NK-Zellen konstitutiv Perforin sowie spezielle lytische Enzyme, die Granzyme, vorrätig. Perforin, ein monomeres Protein, kann – wenn sezerniert – Ca^{2+} - und pH-abhängig polymerisieren und in der Zielzelle eine kleine Pore von wenigen nm formieren. Die kleinen Kanäle können die Integrität der Zelle gefährden, da ein In- und Efflux von H_2O sowie von Ionen möglich wird. Lange galt die (unbestrittene) Annahme, auch die Granzyme würden durch die Perforin-induzierten Poren in die Zelle eindringen. Womöglich gelangen die Granzyme jedoch Clathrin-abhängig in die Zielzelle, d. h. via Rezeptor-vermittelter Endozytose (*endosomalolysis hypothesis*).⁴⁰

Daneben können NK-Zellen ihre Zielzellen aber auch durch die Aktivierung von Todesrezeptoren in den Zelltod treiben. Und zwar via zweier Liganden, die beide der (*tumor necrosis factor*) TNF-Familie angehören: *Fas-Ligand FasL* (= Apo1-Ligand Apo1L = CD95L) und *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand TRAIL* (= Apo2-Ligand Apo2L), die an den *Fas-Rezeptor FasR* (= Apo1-Rezeptor Apo1R = CD95) bzw. an einen *Death Cell Receptor DR* (TRAIL-R1/DR4 und TRAIL-R2/DR5) auf den Zielzellen binden.⁴¹

1.3.2.2. Zytokinproduktion durch NK-Zellen

NK-Zellen agieren aber nicht nur zytotoxisch, sondern üben durch die Sekretion von Zytokinen auch immunmodulierenden Einfluss, u. a. editieren sie angeborene und adaptive Antwort bzw. überbrücken diese. Hervorzuheben sind insbesondere (*tumor necrosis factor- α*) TNF- α und (*interferon- γ*) IFN- γ , aber auch eine Fülle von Interleukinen wie IL-5, IL-10, IL-13 und Chemokinen wie IL-8, MIP-1 α , MIP-1 β , CCL5 sowie GM-CSF^{17,42}. Durch ihr IFN- γ dirigieren sie z. B. die T-Helfer-Zell-Antwort in Richtung der zellvermittelten Th1-Antwort⁴³ oder rekrutieren durch IL-8, MIP-1 α oder RANTES direkt T-Killer-Zellen⁴⁴.

1.4. Tumorantigene

Humane Tumorantigene, deren Entdeckung wie erwähnt einen entscheidenden Impuls für die Forschung auf dem Feld der Tumorummunologie lieferte, werden üblicherweise wie folgt eingeteilt: Primär können die für eine*n Patient*in einzigartigen (*Neoantigene*) gegenüber den von Gruppen geteilten Antigenen abgegrenzt werden. Würden die Neoantigene z. T. nicht interindividuell variieren, wären sie prädestiniert für *targeted therapies*. Da eine derartige Therapie aber nicht breit angewendet werden könnte, sind bis dato v. a. die sog. *shared antigens* als Target adressiert worden. Diese werden weiter in tumorspezifische (*tumor-specific antigens, TSA*) vs. -assoziierte Antigene (*tumor-associated antigens, TAA*) spezifiziert, wobei diese Differenzierung bei einigen Autor*innen (wie auch hier) einer unverbindlicheren Unterteilung weicht, insb. da eine Reihe der als „spezifisch“ deklarierten Antigene retrospektiv als „assoziiert“ revidiert werden musste:

		Tumorantigen-Kategorien	Tumorantigen-Beispiele
TSA	Hohe Tumor-spezifität	Mutierte Antigene	
		– driver mutations	p53 ⁴⁵ , Ras ⁴⁵
		– passenger mutations	MUM-1 ⁸
TAA		Cancer/Testis-Antigene	MAGE-A1 ⁶ , NY-ESO-1 ⁴⁵
		Onkofetale Antigene	CEA ⁴⁵
		Onkovirale Antigene	HPV16 E6, E7 ⁴⁵
	Niedrige Tumor-spezifität	Differenzierungsantigene	Tyrosinase ⁷ , PSA ⁴⁵
		Überexprimierte Antigene	Her2/neu ⁴⁵ , Telomerase ⁴⁵

Tabelle 1: Klassifikation der Tumorantigene. MUM-1= melanoma-associated antigen (mutated) 1, MAGE-A1 = melanoma-associated antigen 1, NY-ESO-1 = New York esophageal squamous cell carcinoma-1, CEA = carcino-embryonic antigen, HPV = human papilloma virus, PSA = prostate-specific antigen.

1.4.1. Tumorantigene mit hoher Tumorspezifität

Unter Verwendung tumorspezifischer zytotoxischer CD8⁺ T-Zellklone (CTL) gelang es van der Bruggen et al. 1991 als ersten eines dieser Antigene (bzw. das kodierende Gen) zur identifizieren: *melanoma-associated antigen 1 MAGE-A1*⁶. Dabei handelt es sich – wie sich herausstellte – um ein sog. Cancer/Testis-Antigen. Diese werden zum einen von einem breiten Spektrum von Tumoren, zum anderen aber auch von den immunprivilegierten Keimzellen des Testis (aber auch vom Trophoblasten bzw. der Plazenta), wo sie dem Immunsystem wegen fehlender MHC I-Moleküle entgehen, exprimiert. Der Aktivierung der Cancer/Germline-Gene in Keim- und Tumorzellen liegt eine CpG-Demethylierung der – i. d. R. (in allen anderen Geweben) methylierten – Promotoren zugrunde. Insofern sind sie semi-spezifisch für Tumoren. Ähnliches gilt auch für die onkofetalen und onkoviralen Antigene. Im engen Sinn tumorspezifisch sind nur die mutierten Antigene. Sie sind die Genprodukte mutierter Gene (Substitution, Insertion, Deletion, Duplikation) oder Chromosomen (Inversion, Translokation), die erst i. R. von Tumorgenese oder -progress entstehen. Gelegentlich sind sie selbst onkogene Driver (*driver mutations*), größtenteils handelt es sich aber um akzidentelle genetische Alterationen ohne onkogenes Potential (*passenger mutations*), wie bei dem von der Gruppe um Coullie erst entdeckten Mutationsantigen, das aus einer *MUM-1-Punktmutation* resultierte^{8,46}

1.4.2. Tumorantigene mit niedriger Tumorspezifität

Differenzierungs- und überexprimierte Antigene dagegen treten zwar tumorassoziiert auf, sind aber nicht sehr spezifisch. Erstere, wie die *Tyrosinase*, werden von einem Tumorzelltyp (Melanomzellen) und dem differenzierten Zelltyp (Melanozyten), der ihnen ursprünglich zugrunde liegt, d. h. zelltypspezifisch exprimiert^{7,46}. Letztere werden zwar von entarteten Zellen überexprimiert, aber auch von nicht-entarteten Zellen anderer Gewebe exprimiert. Hierunter fällt u. a. die deregulierte Expression der ErbB-Rezeptoren, wie die von *Her2/neu*, die gehäuft bei epithelialen Tumoren beobachtet wird: Ca. 10-30 % der gastralen Tumoren und 0-83 % der ösophagealen Tumoren überexprimieren *Her2*⁴⁷. Für das Ovarialkarzinom rangieren die rapportierten Raten zw. 20-30 %, für das Endometriumkarzinom zw. 14-80 %⁴⁷. Vorrangig in Verbindung gebracht wird die *Her2*-Überexpression aber mit Brustkrebs, wo sie zum einen zuerst beschrieben und zum anderen bisher am besten untersucht wurde⁴⁸. Hier liefert die Literatur auch präzisere Prozentsätze: Ca. 15-30 % aller Mammakarzinome sollen *Her2*⁺ sein⁴⁷.

1.4.3. Das tumorassoziierte Antigen *Her2/neu*

1.4.3.1. Rezeptorphysiologie

Her2/neu gehört zu den ErbB-Rezeptoren – vier verwandten, hoch konservierten, weitgehend homologen Rezeptoren: ErbB1 (EGFR oder *Her1*), ErbB2 (*Her2*), ErbB3 (*Her3*) und ErbB4 (*Her4*), die eine von 20 Rezeptor-Tyrosinkinase-Klassen (*RTK class I*) repräsentieren^{49,50}.

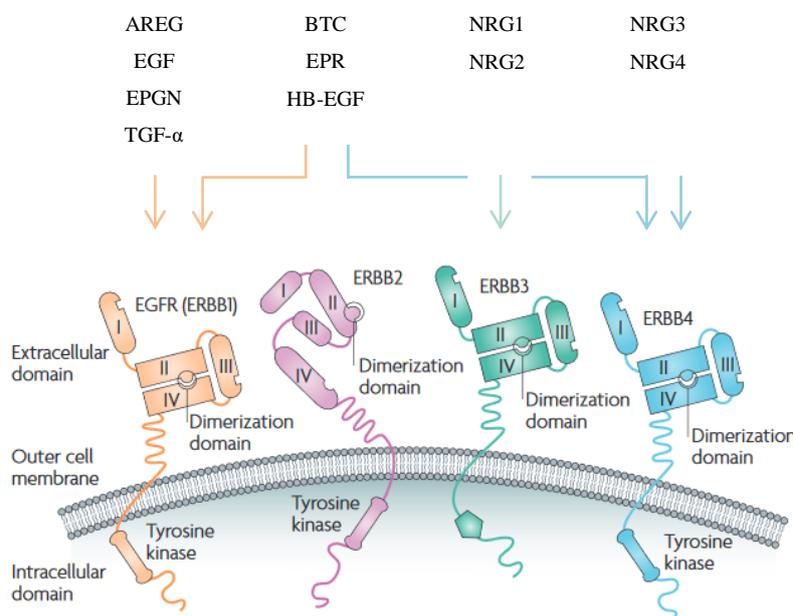


Abbildung 4: Die vier Vertreter der ErbB-Rezeptor-Familie und ihre Liganden. [modifiziert nach Baselga et Swain⁵⁰]

Die ErbB-Rezeptoren gliedern sich zum einen in eine N-terminale extrazelluläre Domäne mit den Unterdomänen I und III, die die Liganden^D binden, und den Unterdomänen II und IV, die nach Ligandenbindung die Dimerisierungsloop (Domäne II) exponieren, zum anderen in eine C-terminale intrazelluläre Domäne, die angrenzend an die Tyrosinkinase die Phosphorylierungsstellen trägt.

Eine einzelne hydrophobe α -Helix ankert die ErbB-Rezeptoren und koppelt die extrazelluläre N-terminale an die intrazelluläre C-terminale Domäne, die die Tyrosinkinase (TK) trägt^C. Die Extrazellulärregion aller vier ErbB-Vertreter gliedert sich in zwei leucinreiche (L1/I und L2/III) sowie zwei cysteinreiche Sequenzen

^C ErbB-Rezeptoren sind sog. Typ-I-(*single-pass*-)Transmembranproteine, die ihr extrazellulärer N- und ihr intrazellulärer C-Terminus definiert. Typ-II-Transmembranproteine sind umgekehrt orientiert.

(CR1/S1/II und CR2/S2/IV), von denen die Sequenzen I und III die Ligandenbindedomäne bilden, während Sequenz II die sog. Dimerisierungsschleife in sich birgt (vgl. Abb. 4).⁵¹

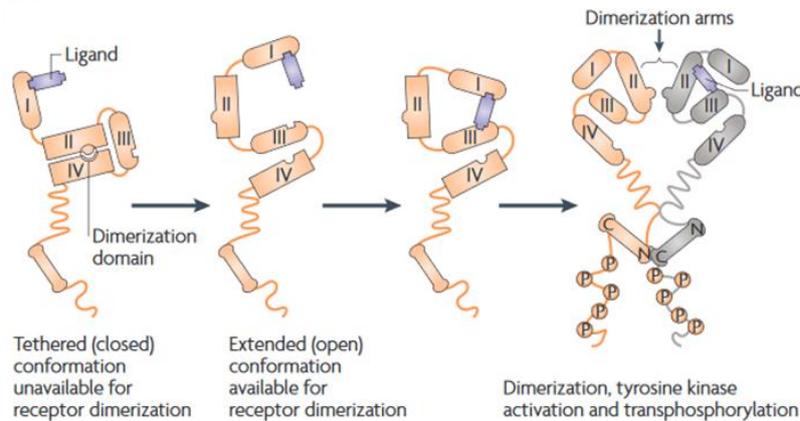


Abbildung 5: Liganden-abhängige ErbB-Rezeptor-Aktivierung.

[modifiziert nach Baselga et Swain⁵⁰]

Ein an ErbB-bindender Ligand löst eine Konformationsänderung aus, durch die die β -Haarnadel exponiert wird, über die die ErbB-Rezeptoren homo- oder heterodimerisieren können. Dies führt zur Aktivierung der Tyrosinkinase und zur Transphosphorylierung.

Liganden^D, die an die Ektodomäne binden, legen die verborgene β -Schleife in Sequenz II frei. Die exponierten β -Haarnadeln zweier ErbB-Rezeptoren interagieren und arrangieren deren laterale Homo- oder Heterodimerisierung. Erst diese Dimerisierung aktiviert die autoinhibierten ErbB-Rezeptoren und die intrazellulären Rezeptor-gekoppelten TKs. Neben dem gekoppelten Enzym verfügen die ErbB-Rezeptoren über eine uneinheitliche Sequenz potentieller Phosphorylierungsstellen. Durch die Dimerisierung gelangen die intrazellulären TK-tragenden Domänen in deren räumliche Nähe und phosphorylieren die Tyrosin-Reste ihres korrespondierenden Rezeptors (*Transphosphorylierung*, vgl. Abb. 5).^{49,51}

An die Phosphotyrosine docken darauf – via *Src-homolog-2 SH2*- oder *phosphotyrosine-binding PTB*-Domänen – Adaptorproteine (wie Grb2, Grb7, Shc, Crk oder Gab1) oder direkt Signalmoleküle (wie Src, Chk, PI3K p85, Shp1 oder Shp2) an, die wiederum weitere in die Übermittlungskette verwickelte Moleküle rekrutieren. Von der Sequenz der potentiellen Phosphorylierungsstellen, die für die vier ErbB-Homologe divergiert, und dem resultierenden Phosphorylierungsmuster, wiederum determiniert durch die dimerisierenden Rezeptoren und Liganden, hängt ab, welche Signalmoleküle rekrutiert und welche Signaltransduktionskaskaden – z. T. auch parallel – in Gang gesetzt werden. Die nachgeschalteten Hauptsignalkaskaden sind der pro-proliferative MAPK/ERK- und der anti-apoptotische PI3K/Akt-Signalweg.^{52,53}

Den um 1985 von Coussens et al. erstbeschriebenen ErbB2 kennzeichnen überdies einige Besonderheiten, die ihn von den übrigen ErbB-Rezeptoren unterscheiden⁵⁴: *Zum einen* bindet ErbB2 keinen der aktivierenden Liganden (*orphan receptor*). Untersuchungen zur 3D-Struktur von ErbB2 deuten gar darauf hin, die vermeintliche Bindungsstelle sei sterisch versperrt und ErbB2 könne infolge keinen (der bekannten) Liganden binden. Da ErbB2 aber anders als die anderen ErbB-Rezeptoren die β -Haarnadel, die der Dimerisierung dient, konstitutiv exponiert, ist er bevorteilt, Liganden-unabhängig in Interaktion treten zu können. Womöglich dimerisieren die übrigen ErbB-Rezeptoren deswegen bevorzugt mit ErbB2. *Zum*

^D ErbB-Liganden: ErbB1: EGF (epidermal growth factor), AREG (amphiregulin), TGF- α (transforming growth factor- α), EPGN (epigen); ErbB1/ErbB4: BTC (betacellulin), HB-EGF (heparin binding EGF-like growth factor), EPR (epiregulin); ErbB3/ErbB4: NRG1 (neuregulin 1), NRG2 (neuregulin 2); ErbB4: NRG3 (neuregulin 3), NRG4 (neuregulin 4)⁵².

anderen zeigen ErbB-Rezeptoren, die mit ErbB2 heterodimerisieren, eine höhere Affinität für ihre aktivierenden Liganden und ErbB2 werden auch langsamer internalisiert. In Summe ergibt sich daraus ein verstärktes und verlängertes Signal.⁵⁵

1.4.3.2. Rezeptorpathologie

Eine gesunde Brustepithelzelle verfügt über zwei Kopien des HER2-Gens (= ERBB2) und um die 20.000 Her2-Rezeptoren⁵⁶. Der aberrant hohen Her2/neu-Expression in entarteten, epithelialen Zellen liegt dagegen i. d. R. eine Amplifikation (> 90 % der Fälle) des Gens zugrunde^{48,57}. Infolge sind in Brustkrebszellen bereits bis zu 50 Kopien des HER2-Gens und bis zu 2.000.000 Her2-Rezeptoren beschrieben worden⁵⁶. Da die HER2-Amplifikation bereits bei *in situ* Tumoren (*ductal carcinoma in situ DCIS*) detektiert werden kann, wird sie als frühes Ereignis der Tumorgenese erachtet⁴⁷. Die Amplifikation des ERBB2-Onkogens bei Brustkrebs beschrieben dabei 1985 als erste King et al.⁴⁸. Dessen prognostische Relevanz deckten aber erst 1987 Slamon et al. auf, die die Amplifikation des ERBB2-Onkogens als unabhängigen negativen Prädiktor für rezidivfreies wie generelles Überleben identifizierten (*time to relapse* und *overall survival*)⁵⁷. Denn die Her2/neu-Überexpression korreliert klinisch mit einem schlechteren Outcome, da sie mit einem aggressiven Phänotyp assoziiert ist, d. h. einem früheren Infiltrieren lokoregionärer Lymphknoten und einer häufigeren hämatogenen Disseminierung. Diese konstatierte Korrelation rückte die Zielstruktur Her2/neu in den Fokus intensiver Forschung.

1.5. Trastuzumab-Therapie

Die sich verdichtende Evidenz um Her2/neu hatte u. a. die Genentech-Gruppe um Ullrich angetrieben, nach einem gegen Her2/neu gerichteten AK zu fahnden⁵⁸. In einem Panel von über 100 anti-ErbB2-AK übte 4D5 den größten inhibierenden Effekt auf aberrant ErbB2-exprimierende Tumorzellen und wurde für klinische Studien selektiert⁵⁹. Der murine Prototyp muMAb 4D5 wurde zum humanisierten huMAb 4D5 rekombiniert und hielt als Trastuzumab – bzw. unter dem Handelsnamen Herceptin – Einzug in die Klinik⁶⁰. Dessen Grundgerüst bildet ein menschliches Immunglobulin: IgG1κ (~ 95 %) ⁶¹. Lediglich die hypervariablen Regionen (*complementarity-determining regions CDRs*), die eigentlichen Erkennungsstrukturen des Antigen-bindenden Fab-Fragmentes, sind noch murin (~ 5 %; *CDR-grafted antibodies*)^{61,62}. Über diese CDR-Schleifen erkennt Trastuzumab sein spezifisches Epitop juxtamembranär auf der Extrazellulärdomäne IV des ErbB2-Ektorezeptor⁶³.

1.5.1. Wirkung

Durch die Her2-Bindung vermittelt Trastuzumab diverse *direkte* (Fab-abhängige) wie *indirekte* (Fc-abhängige) komplement- bzw. immunvermittelte Effekte, die sich im Ergebnis anti-proliferativ oder pro-apoptotisch auswirken.

1.5.1.1. Direkte Effekte

Trastuzumab beeinflusst das Her2-Signaling und die nachgeschalteten Signaltransduktionskaskaden: indirekt, indem es zu einer Herunterregulierung von Her2 führt (Ubiquitinierung von ErbB2 durch Cbl,

Endozytose des ubiquitinierten ErbB2-Cbl-Komplexes^E) und direkt, indem es intrazellulär die MAPK/ERK-, aber auch die PI3K/Akt-Kaskade inhibiert (letztere, da es PTEN, deren Gegenspieler, aktiviert)⁶⁵. G₁-Arrest oder Apoptose triggert Trastuzumab aber auch durch Interferenz mit Zellzyklus- wie Zelltod-regulierenden Proteinen (Induktion des CDK-Inhibitors p27^{Kip1}, Reduktion der CDK2; Herunterregulierung von Bcl-2)^{65,66}. Es scheint auch anti-angiogenetisch zu agieren (↓ pro-angiogenetisches VEGF, TGF- α , Ang-1 und PAI-1; ↑ anti-angiogenetisches TSP-1)⁶⁷.

Darüber hinaus blockiert Trastuzumab, indem es Shedding-Enzymen – wie ADAMTS-10 – sterisch die „Sollbruchstelle“ zu versperren scheint, das Shedding der extrazellulären Domäne von Her2^{68,69}. Durch die Proteolyse würde ein auf 95 kDa verkürztes Rezeptor-Rudiment resultieren, p95Her2, dem eine gegenüber p185Her2 10-100-fach höhere Onkogenität attribuiert wird⁷⁰. Grund dafür ist, dass die Kinase dann konstitutiv aktiv ist (in vitro). p95Her2 (*carboxy-terminal fragment CTF*) kann auf Her2⁺ BC-Tumoren und die extrazelluläre Domäne (*extracellular domain ECD*) im Serum von Her2⁺ BC-Patient*innen detektiert werden, wobei hohe Her2-ECD-Serumspiegel mit einer schlechteren Prognose korrelieren⁶⁸. Eine Reduktion der Her2-ECD-Levels indiziert dagegen ein Ansprechen auf eine Trastuzumab-Therapie⁶⁹.

1.5.1.2. Indirekte Effekte

Unter die indirekten Effekte fallen die komplementvermittelte (zelluläre) Zytotoxizität (*complement-dependent cytotoxicity CDC* oder *complement-dependent cellular cytotoxicity CDCC*) und die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC*). Diese Effekte beruhen auf dem aktiven Antikörper-abhängigen Zutun des Immunsystems. Trastuzumab bindet via Fab-Fragment an Her2, während über das Fc-Fragment Komplement oder Effektorzellen, die über einen Fc γ -Rezeptor verfügen – v. a. NK-Zellen^F – rekrutiert werden, die die Her2⁺ Zielzelle letztlich lysieren (vgl. Abb. 6)^{71,72}.

V. a. ADCC stellte sich als ein Hauptwirkungsmechanismus heraus. Denn in vivo scheinen die direkten Effekte, d. h. die Blockade der Her2-Signalkaskade nicht hinreichend, um das Wachstum von Her2⁺ Tumoren aufzuhalten. Clynes et al. demonstrierten dies zum einen durch Knockout des Fc γ -Rezeptors III, zum anderen durch eine Veränderung des Fc-Fragments des Anti-Her2-AKs, sodass dieses nicht mehr von Fc-Rezeptoren detektiert werden konnte, wodurch sich die Anti-Tumor-Aktivität der Her2-Antikörpertherapie jeweils signifikant herabgesetzt zeigte.⁷³

^E Die Her2-Herunterregulierung als Trastuzumab-Mechanismus wird kontrovers diskutiert. Austin et al. lieferten z. B. gegenteilige Daten⁶⁴.

^F Neben den NK-Zellen exprimieren aber auch Monozyten, Makrophagen und Granulozyten Fc-Rezeptoren.

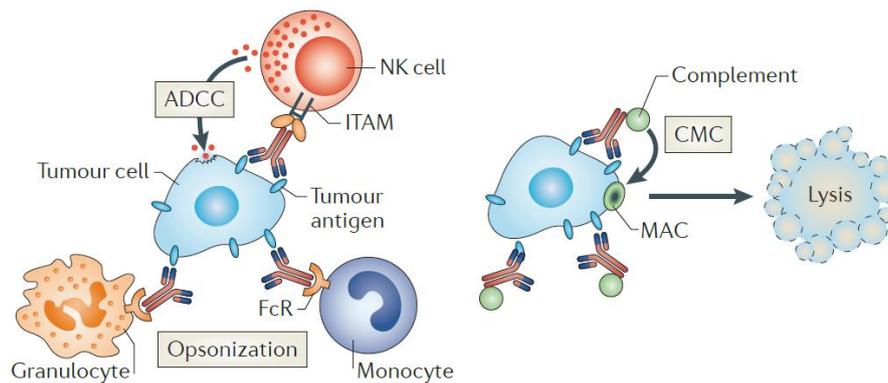


Abbildung 6: Indirekte (immunvermittelte) Effekte von Antikörpertherapien. [aus Weiner⁷⁴] Der Anti-Her2-AK Trastuzumab wirkt direkt wie indirekt an der Targetzelle. Die indirekten Effekte vermittelt er, indem er die Her2⁺ Zielzellen „opsoniert“, die daraufhin zellulär z. B. durch NK-Zellen (antibody-dependent cellular cytotoxicity ADCC, *links*) oder humoral, d. h. durch Komplement (complement-mediated cytotoxicity CMC, *rechts*) attackiert werden können. Komplement triggert die Zielzelllyse wiederum entweder direkt (via *membrane attack complex* MAC, complement-dependent cytotoxicity CDC) oder indirekt durch Rekrutierung phagozytierende Zellen der angeborenen Abwehr (complement-dependent cellular cytotoxicity CDCC).

1.5.2. Nebenwirkungen

Als *targeted therapy* galt Trastuzumab als äußerst gut verträglich. Erst im ersten Phase-III-Trial trat eine unerwartete Rate kardialer Komplikationen zu Tage⁷⁵, weswegen hiernach alle klinischen Studien erneut durch ein unabhängiges Komitee aufgerollt wurden. Dieses ermittelte, dass die Inzidenz kardialer Nebenwirkungen bei Anthracyclin-basierter Trastuzumab-Therapie bei 27 %, bei Taxan-basierter Trastuzumab-Therapie bei 13 % und bei alleiniger Antikörpertherapie zw. 3-7 % lag (wobei aber alle Patient*innen in ihrer Vorgeschichte bereits mit einem Anthracyclin behandelt worden waren)⁷⁶. Die kardialen Komplikationen decken ein breites Spektrum, von der reversibel reduzierten (*left ventricular ejection fraction*) LVEF bis hin zur v. a. bei begleitender Anthracyclin-Gabe auftretenden schweren Herzinsuffizienz (*New York Heart Association*) NYHA III-IV, ab. Auf zellulärer Ebene wird v. a. ein „*on-target*“ *off-tumor* Effekt verdächtigt, d. h. eine Störung des homöostatischen Her2-Signaling in den Kardiocyten (dilatative Kardiomyopathie im Her2-mutierten Tiermodell⁷⁷). Da andere Her2-Inhibitoren (Perjeta, Lapatinib) kardial nebenwirkungsärmer sind, werden Trastuzumab aber auch potentielle „*off-target*“ Effekte unterstellt⁷⁸.

In den randomisierten kontrollierten klinischen Studien fiel interessanterweise auch auf, dass die Inzidenz der Chemo-induzierten Neutropenie bei begleitender Trastuzumab-Therapie zunimmt⁷⁹.

1.6. (Neo-)Adjuvante Chemotherapie

Aktuell haben bereits über 30 gegen Tumorantigene gerichtete rekombinante Antikörper ihren Einzug in die Klinik gehalten, davon zwei gegen Her2 gerichtete Antikörper: Trastuzumab (4D5, Herceptin) und Pertuzumab (2C4, Perjeta)⁸⁰. Trastuzumab wurde dabei zunächst für das metastasierte Mammakarzinom zugelassen (EU: 2000), die Zulassung aber bald auch auf die (neo-)adjuvante Therapie des nicht-metastasierten Mammakarzinoms ausgeweitet (EU: 2006).

Laut der S3-Leitlinie 09/2018 der AWMF (*Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.*) sollte die Antikörpertherapie bei Patient*innen mit Her2⁺ BC (mit einem

Durchmesser von $\geq 1\text{cm}$, N \pm , M $-$) aber nicht alleine, sondern kombiniert mit einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie erfolgen (Level of Evidence: 1b). Die (neo-)adjuvante Chemotherapie sollte dabei ein Anthracyclin gefolgt von einem Taxan enthalten und über 18-24 Wochen verabreicht werden (Level of Evidence: 1a).⁸¹

Die beiden zur (neo-) adjuvanten Therapie empfohlenen antineoplastischen Wirkstoffgruppen, *Anthracycline* und *Taxane*, sowie zwei ihrer wichtigsten Vertreter, *Epirubicin* und *Paclitaxel*, die in dieser Arbeit verwendet wurden, werden im Folgenden vorgestellt.

1.6.1. Taxane

Entdeckt wurde die Wirkstoffgruppe der Taxane 1962 i. R. eines großangelegten Screening-Projekts des *National Cancer Institute NCI*, das weitgehend willkürlich um die 115.000 pflanzliche Proben sammelte, um sie auf ihre zytotoxische Potenz zu testen: darunter auch die Rinde der pazifischen Eibe, *Taxus brevifolia*, die der Botaniker Barclay im Gifford Pinchot National Forest (Washington) aufblas^{82,83}. Deren Rindenextrakt, das in vitro zytotoxische Wirkung gegen eine Tumorzelllinie entfaltete, wurde deswegen von Wall und Wani näher analysiert. Ihnen gelang es, das eigentliche Agens – Taxol bzw. Paclitaxel – zu isolieren und schließlich dessen chemische Struktur zu identifizieren⁸⁴. Nach der Entdeckung wurde zuerst spekuliert, die Taxane könnten wie die bereits bekannten Vinca-Alkaloide mit den Mikrotubuli interferieren, d. h. diese destabilisieren. Doch das Gegenteil stellte sich heraus, sie stabilisieren diese⁸⁵.

1.6.1.1. Wirkung

Um die Wirkungsweise der Taxane nachvollziehen zu können, empfiehlt sich ein kurzes Studium der Mikrotubuli: Globuläre α - und β -Tubuline formen die Tubulindimere. Die Tubulindimere reihen sich zu länglichen Protofilamenten aneinander. Parallel orientierte Protofilamente bilden eine einige μm lange Röhre, den 25 nm durchmessenden Mikrotubulus. Die dimere Orientierung (der Tubulin-Heterodimere) definiert dabei die Polarität des Mikrotubulus mit einem Minus- (α -Untereinheit) und Plus-Pol (β -Untereinheit). An beiden Polen lagern sich GTP-abhängig Heterodimere an oder ab, am Plus-Pol deutlich schneller. Dieses Polymerisieren wie Depolymerisieren der Tubulindimere unterliegt einem Gleichgewicht, der *dynamischen Instabilität*⁸⁶.

Indem Paclitaxel eine T-förmige Konformation annimmt, bindet es im Inneren des Mikrotubulus hinter der sog. M-Schleife des β -Tubulins⁸⁷. Die M-Schleifen der β -Monomere stehen in lateralem Kontakt mit den β -Monomeren paralleler Protofilamente, die den Mikrotubulus stabilisieren. Paclitaxel soll die stabilisierenden, lateralen Interaktionen stärken, d. h. derart GDP-gebundenes Tubulin stabilisieren⁸⁸.

Für einen funktionierenden Zellteilungszyklus ist aber gerade die dynamische Instabilität der Mikrotubuli entscheidend, da sie den Spindelapparat stellen. Zentrosome, die zu den entgegengesetzte Zellpolen wandern, koordinieren diesen Spindelapparat (*microtubule-organizing center = MTOC*). Die Mikrotubuli sind darin mit ihrem Minus-Ende verankert und verlängern sich v. a. an ihrem Plus-Ende von beiden Polen in Richtung der Äquatorialplatte der Zelle. Dort binden sie an die Centromere der identischen, paarigen Chromatiden – bzw. deren Kinetochore. Von beiden Polen an die paarigen Chromatiden angedockt, separieren sie die

Schwester-Chromatiden. Die Chromatiden werden zu den entgegengesetzten Zellpolen gezogen und derart auf die Tochterzellen aufgeteilt.

Paclitaxel torpediert die Trennung der paarigen Chromatiden, v. a. da es die (Anhaftung der) Kinetochor-Mikrotubuli behindert. Nicht (korrekt) angeheftete Kinetochore arretieren die Zelle, indem sie eine Signaltransduktionskaskade loslösen, die im Ergebnis den *Anaphase-promoting complex/cyclosome APC/C*, d. h. den Progress der Zelle in die Anaphase, inhibiert. Es resultiert ein Mitoseblock, der letztlich den Zelltod bedeutet.⁸³

1.6.1.2. Nebenwirkungen

Paclitaxel ist hydrophob. Für gewöhnlich ist der Paclitaxel-Lösung deswegen ein Detergens, i. d. R. Cremophor EL, beigemischt. Um Hypersensitivitätsreaktionen, die insbesondere durch diesen Lösungsvermittler verschuldet sind, vorzubeugen, werden die Patient*innen mit einem Glukokortikoid, einem H₁- und H₂-Blocker prämediziert. Bei neueren Cremophor-freien Formulierungen wie *nab-Paclitaxel (nanoparticle albumin bound paclitaxel)*, bei dem Paclitaxel an Albumin gebunden vorliegt, kann dagegen auf deren präventive Gabe verzichtet werden. Daneben leiden die behandelten Patient*innen v. a. an peripheren Neuropathien, oft in Form von Parästhesien. Zu einer Dosislimitierung führt jedoch i. d. R. die Myelosuppression, insb. die schweren Neutropenien.⁸⁹

1.6.2. Anthracycline

Auch die Anthracycline sind bei der gezielten Suche nach „natürlicher“ Antitumor-Aktivität – jedoch der von Bodennikroben – entdeckt worden. In einer Bodenprobe, die in der Umgebung einer im 13. Jahrhundert errichteten Burg in Andria, Apulien, entnommen wurde, fanden Forscher*innen von Farmitalia die Spezies *Streptomyces peucetius*. Das Bakterium produzierte ein Antibiotikum mit Antitumor-Aktivität: *Daunomycin*. Auf das auch von der *Streptomyces coeruleorubidus*-Spezies synthetisierte Antibiotikum wurde zeitgleich eine weitere Forschergruppe, die von Rhône-Poulenc, aufmerksam und beschrieb es aufgrund der leuchtend roten Kolorierung als *Rubidomycin*. Damit war 1963 das (erste) Anthracyclin *Daunorubicin* (Amalgamierung von *Daunomycin* + *Rubidomycin*) entdeckt.⁹⁰

Es folgte *Doxorubicin (Adriamycin)*, ein potenteres Daunorubicin-Derivat. Die Gruppe um Arcamone fahndete in den Folgejahren forciert nach weiteren Anthracyclin-Analoga mit einem besseren Wirkungs-/Nebenwirkungsprofil, indem sie dessen chemisches Grundgerüst modifizierten. *Epirubicin*, semisynthetisches 4'-epi-Isomer von Doxorubicin, trat als erstes Präparat aus dieser Reihe in klinische Studien ein. Es zeigt ein gegenüber Doxorubicin günstigeres Nebenwirkungsprofil, insb. im Hinblick auf die gefürchteten kardialen Komplikationen.⁹¹

1.6.2.1. Wirkung

Die Wirkungen wie Nebenwirkungen der Anthracycline werden im Wesentlichen *durch vier biochemische Reaktionen bzw. Interaktionen* erklärt:

Anthracycline interkalieren in die DNA, indem sie ihren planaren, viergliedrigen Ring zwischen zwei Basenpaare schieben. Dies ist ein folgenreiches Ereignis. Zum einen behindert die Interkalation direkt die DNA-Replikation. Zum anderen – und dies scheint der maßgebliche Mechanismus – inhibieren die

Anthracycline dadurch auch die *Topoisomerase II (Top II)*. Denn neben der Doppelhelix binden sie auch an Top II. Top II sind Schlüsselenzyme i. R. der Zellteilung, da sie die Topologie der DNA regulieren. Sie können verdrehte Doppelhelices entwinden. Hierfür brechen sie die Doppelhelix vorübergehend ATP-abhängig auf und fädeln einen anderen Teil der Helix durch die Bruchlücke ehe sie sie wieder schließen. So entspannen sie die Superspiralisierungen. Anthracycline stabilisieren diesen sog. *cleavage complex* und behindern die Re-Verknüpfung der Bruchstücke durch die Top II. Infolge verkehren sie die Top II, ein essentielles Enzym, in ein endogenes Toxin (*wolf in sheep's clothing*, Dewese et Osheroff⁹²): Persistieren die DNA-Doppelstrangbrüche nämlich, resultiert ein Zellzyklusstopp und letztlich der Zelltod. Wirbeltiere exprimieren zwei Top II-Isoenzyme. Die wesentliche Rolle i. R. der Zellteilung wird der Top II α zugeschrieben, die in proliferierenden Zellen – wie Tumorzellen – enorm hochreguliert wird, während die Expression der Top II β in differenzierten (= ruhenden) und proliferierenden Zellen nicht nennenswert divergiert. Auch dissoziiert die Top II α , anders als die Top II β , während eines Zellteilungszyklus nicht von den Chromosomen, sondern haftet an der DNA. Weiterhin kontribuieren freie Radikale, die die Integrität von DNA und Lipiden gefährden, zur Wirkung der Anthracycline. Denn ihr chemisches Gerüst verfügt über chinoide Systeme, die in Redoxreaktionen involviert sind, i. R. derer reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species ROS*) entstehen. Inwieweit die Wirkung und Nebenwirkungen der Anthracycline aber auf der Bildung freier Radikale beruht, ist (noch) nicht komplett geklärt.⁹³

Pang et al. gelang es 2013 noch ein weiteres Wirkprinzip aufzudecken: Anthracycline verdrängen Histone – wie die Histonvariante H2A, die in die DNA-Reparatur verwickelt ist – von offenen Chromosomenbereichen, wodurch sie direkt das Transkriptom und indirekt das Proteom von Tumorzellen beeinflussen⁹⁴.

1.6.2.2. Nebenwirkungen

Als gefährlichste Nebenwirkung der Anthracycline ist ihre Kardiotoxizität, die akut aber auch protrahiert auftreten kann, zu nennen. Akute kardiale Komplikationen, die sich häufig in Form von Herzrhythmusstörungen äußern, treten unmittelbar unter bzw. nach der Anthracyclin-Applikation auf und korrelieren nicht mit den applizierten Dosen. Sie sind i. d. R. selbstlimitierend. Folgeschwerer ist die chronische (Links-) Herzinsuffizienz, die sich noch nach Jahren oder gar Jahrzehnten entwickeln kann. Ihre Prävalenz liegt niedriger als die der akuten kardialen Komplikationen, korreliert aber mit den applizierten Anthracyclin-Dosen. Die Schwellen-/Grenzdosis für Epirubicin wird mit 900 mg/m² angegeben.⁹⁵

Strukturell liegen der chronischen Kardiotoxizität eine vakuoläre Degeneration von Myozten und ein Verlust von Myofibrillen mit konsekutiver interstitieller Fibrosierung zugrunde, der letztlich in einer lebensbedrohlichen kongestiven Herzinsuffizienz kulminieren kann⁹⁶. Qualitativ sind die kardialen Komplikationen aller Anthracycline ähnlich, jedoch werden diese Nebenwirkungen seltener unter Epirubicin (> 900 mg/m²: 1-11 % LV-Dysfunktion) als unter den Derivaten Dauno- oder Doxorubicin (> 700 mg/m²: 18-48 % LV-Dysfunktion) verzeichnet⁹⁷.

Akut sind aber auch die applizierten Anthracycline am häufigsten aufgrund hämatologischer Komplikationen, v. a. einer reversiblen Leuko- und/oder Neutropenie, in ihrer Dosis limitiert. Zudem wurden sekundäre Leukämien berichtet.⁹⁵

1.7. Effekte von Chemotherapie auf die Anti-Tumor-Immunantwort

1.7.1. Immunsuppression vs. Immunmodulierung

Fast alle Zytostatika sind hämatotoxisch. Denn Zytostatika agieren wesentlich weniger selektiv als *targeted therapies*. Sie zielen auf den proliferierenden Zellpool ab. Neben den Tumorzellen richten sie sich auch gegen sich schnell erneuernde Wechselgewebe wie die Blutzellen, insb. die weiße Blutzellreihe, weswegen Leuko- wie Lymphopenien gefürchtet werden.

V. a. (anhaltende) Neutropenien korrelieren dabei mit Infektionen (Paclitaxel: 18-30 %, Epirubicin: 15-22 %) ^{89,95}. Von den Paclitaxel-behandelten Patient*innen entwickeln 87-90 % eine Neutropenie (< 2.000/mm³), 27-52 % eine schwere Neutropenie (< 500/mm³) ⁸⁹. Für Epirubicin liegen die Inzidenzen zw. 54-80 % (< 2.000/mm³) bzw. 10-67 % (< 500/mm³) ⁹⁵. Bei beiden sind sie am häufigsten dosislimitierend. Während die Neutrophilen ihren Nadir i. d. R. zügig überwinden (Paclitaxel: nach 15-21 d, Epirubicin: nach 21 d), brauchen die Lymphozyten länger, um sich zu erholen ^{89,95}.

Da eine Lymphodepletion bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen intendiert ist, haben einige primär für die Tumorbekämpfung etablierte (Chemo-)Therapeutika (in niedrigerer Dosierung) auch Einzug in deren Therapie gehalten – wie z. B. Methotrexat. Eingeführt zur Therapie akuter Leukämien bei Kindern, findet es heute v. a. als Basistherapie der rheumatoiden Arthritis breite Anwendung, da es u. a. die Proliferation krankheitsrelevanter, aktivierter T-Zellen inhibiert. Doch i. d. R. ist die resultierende systemische Immunsuppression eine unerwünschte, mitunter lebensbedrohliche Nebenwirkung.

Kang et al., die ein Kollektiv von 80 behandelten BC-Patient*innen betrachteten, zeigten, dass sich die Lymphozyten bei vielen der Behandelten (Chemo- und/oder Radiotherapie) auch nach einem Jahr noch nicht wieder regeneriert hatten. Von den Chemotherapie-Patient*innen (n = 20), die v. a. Anthracyclin- oder Taxan-basiert behandelt worden waren, hatten nach zwei Monaten über die Hälfte der Patient*innen (59 %), nach zwölf Monaten knapp ein Viertel (24 %) der Patient*innen ihr NK-Niveau noch nicht wiedererlangt. Auch die NK-Zytotoxizität zeigte sich nachhaltig beeinträchtigt: Lediglich bei knapp einem Viertel (18 %) der Patient*innen war sie nach einem Jahr wieder wie vorher ⁹⁸. Tsavaris et al. untersuchten in ihrer Arbeit nur Taxan-therapierte BC-Patient*innen (n = 30) – mit gegenteiligem Ergebnis. Zuerst verglichen sie vor Beginn der Behandlung deren peripheres Lymphozyten-/Zytokinprofil mit dem Gesunder. Bei den BC-Patient*innen fielen im Vergleich erniedrigte IL-2-, IFN- γ - und GM-CSF-Serumspiegel wie auch eine erniedrigte NK-(natural killer)- und LAK-(lymphokine-activated killer)-Aktivität auf. Die Taxan-Therapie steigerte all diese Surrogat-Parameter signifikant ⁹⁹. Eine weitere Arbeit, die von Wijayahadi et al., konzentrierte sich auf Anthracyclin-therapierte BC-Patient*innen (n = 80). Die Anthracyclin-Regime führten zwar zu einer Lymphopenie, der prozentuale Anteil an NK- und zytotoxischen T-Zellen, die die zelluläre Anti-Tumor-Antwort tragen, nahm aber zu. Denn v. a. die B-Zellen fielen gravierend ab ¹⁰⁰.

Allein aufgrund einer Chemo-induzierten (peripheren) Leuko-/Lymphopenie kann folglich nicht auf eine anerge (zelluläre) Anti-Tumor-Immunantwort geschlossen werden. *Zum einen* darf das i. d. R. analysierte periphere Immunprofil nicht ohne weiteres mit dem im Tumormikromilieu gleichgesetzt werden. Und *zum anderen* reagieren die einzelnen Immunzellreihen – auch Chemotherapie-abhängig – nicht alle gleich

empfindlich. Im Idealfall könnte die Depletion semi-selektiv Tumor-tolerogene Subsets betreffen. Paclitaxel z. B., zeigten u. a. Vicari et al., dezimiere v. a. (immunsuppressive) CD4⁺ Foxp3⁺ T-Zellen, aber kaum CD4⁺ Foxp3⁻ T-Zellen. Zudem proliferierten tumorspezifische CD8⁺ T-Zellen in deren Setting nicht nur besser, sondern wurden auch effektiver in den Tumor rekrutiert¹⁰¹.

1.7.2. Tolerogener vs. immunogener Zelltod

Der zweite zentrale Grund zur Annahme, Chemotherapie torpediere eine effektive Anti-Tumor-Antwort, rührt daher, dass Zytostatika Tumorzellen (i. d. R.) in den programmierten, tolerogenen Zelltod treiben.

Programmed cell death (PCD) ist primär ein physiologischer Prozess. Die Zelle leitet ihre Beseitigung selbst ein. Ihre „Selbsttötung“ initiiert durch in- oder extrinsische Stimuli wie z. B. Zytostatika, läuft genetisch gesteuert – oft (*Caspase*-abhängig) als Apoptose – ab: Die Zelle schrumpft (*Pyknose*), der Zellkern und der Zellleib werden in kleine Vesikel (*apoptotic bodies*) zerschnürt, die direkt phagozytiert werden. Die Zelle geht immunologisch stumm unter, ohne den Zellverbund zu stören. Diese These beruht u. a. auch auf der Annahme, dass es gar gefährlich wäre, würde ein physiologischer Prozess wie PCD eine Entzündung schüren. Schließlich trifft dieser Zelltod allein i. R. des *tissue turnover* mehrere Millionen seneszente, menschliche Zellen/d – anders als die Nekrose, auch als *accidental cell death (ACD)* bezeichnet, die infolge einer irreversiblen, gravierenden Beeinträchtigung eintritt. Sie ist ein pathologisches Phänomen, das zur Zellschwellung (*Onkose*) und letztlich -lyse führt. Die zerfließende Zelle alarmiert die Abwehr und ruft eine Entzündung hervor, die auch auf das umgebende Gewebe übergreift. Bedingt durch diese Entzündung ereilt Nekrose i. d. R. nicht nur eine einzelne Zelle, sondern oft den ganzen Zellverband.

Aber auch PCD tritt nicht nur im Kontext unbedenklicher, physiologischer Stoffwechselprozesse auf. Auch Zytostatika lösen, wie bereits beschrieben, v. a. Apoptose aus. Durch sezernierte *find-me* und externalisierte *eat-me* Signale wie Lysophosphatidylcholin und Phosphatidylserin sorgen die sterbenden (Tumor-)Zellen dafür, dass ihre *apoptotic bodies* prompt durch Phagozyten abgeräumt werden, ehe (andere) Immunzellen auf den Plan gerufen werden^{102,103}. Diejenigen Phagozyten, die die apoptotic bodies beseitigen, inhibieren z. T. proaktiv die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine¹⁰⁴.

Doch die Erkenntnisse der letzten zehn Jahre ziehen die Doktrin, PCD sei per se nicht-immunogen, zunehmend in Zweifel. Ob PCD nicht-immunogen oder immunogen wirkt, hängt nämlich v. a. auch von der Initiation ab. Denn abhängig vom „tödlichen Stimulus“ geben sich auch apoptotische (Tumor-)Zellen zu erkennen. Die Gruppe um Kroemer demonstrierte dies 2005 für *Doxorubicin* und löste zwei Jahre später auch auf wie¹⁰⁵: durch *damage associated molecular patterns DAMPs*, allen voran *calreticulin CRT*, *high mobility group box 1 protein HMGB1*, *heat shock proteins HSP70/90* und *adenosine triphosphate ATP*¹⁰⁶. DAMPs an sich sind harmlos. Physiologisch sind diese Protein- wie Nicht-Protein-Moleküle in den Stoffwechsel im Inneren der Zellen involviert, ergo vor dem Immunsystem verborgen (*hidden self model* nach Kono und Rocke)¹⁰⁷. Gefahr signalisieren sie erst, da sie aus der Zelle emittiert oder auf ihr exprimiert werden: passiv i. R. von Nekrose oder aktiv in einigen Fällen von Apoptose, woraufhin sie als Adjuvantien agieren. Von dendritischen Zellen v. a. via *pattern-recognition receptors PRRs* detektiert, vermögen DAMPs eine spezifische T-Zell-vermittelte Anti-Tumor-Antwort zu triggern: Aufnahme tumorassoziierter Antigene durch

DCs (CRT-getriggert) → Aktivierung der DCs (HSP-getriggert) → Antigen-Prozessierung und -Präsentierung durch DCs an die T-Zellen (HMGB1-getriggert) → Inflammasom-abhängige Sekretion von IL-1 β durch die DCs (ATP-abhängig) → Priming der CD8⁺ T-Zellen → zelluläre Anti-Tumor-Immunantwort (vgl. Abb. 7)^{108,109}.

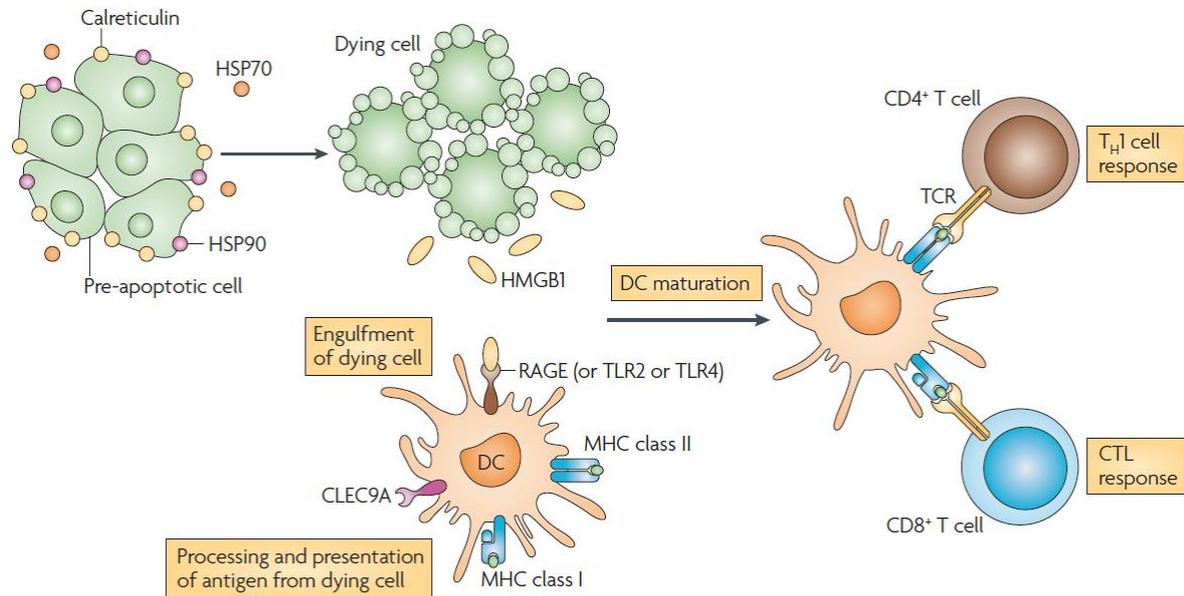


Abbildung 7: Immunogener Zelltod. [aus Green et al.¹⁰⁸] Immunogener Zelltod ist durch die Emission/Expression von DAMPs (calreticulin CRT, high mobility group box 1 protein HMGB1, heat shock proteins HSP70/90) in zeitlich determinierter Abfolge definiert, die (u. a. via receptor for advanced glycation endproduct RAGE oder toll like receptors TLRs) DCs aktivieren, (via C-type lectin domain family 9 member A CLEC9A) (Tumor-)Antigene der zugrunde gehenden Zellen aufzunehmen und CD4⁺/8⁺ T-Zellen darzubieten. Die aktivierten T-Zellen können daraufhin eine zelluläre Anti-Tumor-Antwort initiieren.

Neben Doxorubicin wurden u. a. auch Daunorubicin, Idarubicin (Anthracycline), Bortezomib (Dipeptid), Cyclophosphamid (Oxazaphosphorin), Mitoxantron (Anthracendion) und Oxaliplatin (Platinderivat) als (*immunogenic cell death*) ICD-Induktoren identifiziert. Die Fähigkeit zur Induktion von ICD gründet wiederum auf der Fähigkeit (*endoplasmic reticulum*) ER-Stress und (*reactive oxygen species*) ROS zu generieren (direkt oder indirekt, d. h. kollateral), die die Danger-Signalkaskade anschalten, an deren Ende die Expression/Emission der DAMPs steht.¹¹⁰

Bemerkenswerterweise tauchen derart auch Zellen mit komplexem Karyotyp auf dem Radar der angeborenen/adaptiven Abwehr auf¹¹¹. Denn Polyploidie führt ebenso über ER-Stress zur Expression des eigentlich ER-sessilen Calreticulin¹¹². Neben ecto-Calreticulin triggert ein aberranter Karyotyp aber auch die Expression von Liganden aktivierender NK-Zell-Rezeptoren, nämlich der von DNAM-1 und NKG2D. Dies konnte sowohl für primär als auch sekundär aneuploide Zellen, d. h. Zellen die pharmakologisch – z. B. durch ein Taxan – an der Zellteilung gehindert wurden, gezeigt werden^{113,114}.

Abschließend kann also konstatiert werden, dass Zytostatika – entgegen der allgemeinen Annahme – z. T. sogar als Adjuvantien agieren können und ihr Einfluss auf die immunologische Tumorabwehr daher dezidiert betrachtet werden muss.

2. Zielsetzung

Brustkrebs ist leider noch immer die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Da bei etwa einem Viertel der Patient*innen, die an Brustkrebs leiden, eine Überexpression von Her2/neu besteht, die mit einem schlechteren klinischen Outcome korreliert, rückte Her2/neu sehr schnell in den Fokus des Forschungsinteresses – v. a. auch als Target zielgerichteter Therapien. Der infolge entwickelte, gegen Her2-gerichtete therapeutische Antikörper *Trastuzumab (Herceptin)* erzielte beeindruckende klinische Erfolge bei den Betroffenen.

Durch die Her2-Bindung inhibiert Trastuzumab dabei zum einen *direkt* Her2-Signaling und Her2-Signaltransduktionskaskaden. Zum anderen vermittelt es aber auch *indirekte* Effekte, die die angeborene Abwehr – v. a. NK-Zellen – involvieren. Denn NK-Zellen attackieren die Her2⁺ Zielzellen antikörperabhängig, d. h. wenn diese mit Trastuzumab opsoniert sind. Via ihres Fc γ -Rezeptors IIIA (CD16) erkennen sie das Fc-Fragment des an Her2 gebundenen Anti-Her2-Antikörpers und töten die Her2⁺ Tumorzellen. Die Datenlage deutet – auch wenn noch immer kontrovers diskutiert – darauf hin, der Erfolg der Antikörpertherapie hänge elementar von dieser antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) ab, die v. a. von NK-Zellen getragen wird. Insofern scheint ein funktionierendes Immunsystem essentiell.

Laut aktueller Leitlinie sollte die Anti-Her2-Antikörpertherapie bei Patient*innen mit Her2⁺ Brustkrebs aber nicht alleine, sondern kombiniert mit einer (neo-)adjuvanten Chemotherapie, einem *Anthracyclin* oder einem *Taxan*, erfolgen. Da diese aber nicht-selektiv gegen alle sich schnell teilenden Zellen – *Tumor-* ebenso wie *Immunzellen* – gerichtet sind, muss mit Leuko- wie Lymphopenien und letztlich einer Immunsuppression gerechnet werden. Folgerichtig wäre auch eine Kompromittierung der NK-Zellen und der NK-Zell-vermittelten ADCC anzunehmen. Einige konventionelle Chemotherapeutika agieren aber – entgegen der allgemeinen Annahme – immunogen und ziehen diesen deduktiven Schluss in Zweifel: Allein aufgrund der peripheren Leuko- und/oder Lymphopenie unter Chemotherapie kann daher nicht auf eine anerge Anti-Tumor-Immunantwort oder ADCC geschlossen werden. Deshalb setzte es sich diese Arbeit zum Ziel, die Einflüsse einer Anthracyclin- oder Taxan-Therapie auf die ADCC aufzuarbeiten, um zu klären, ob und wenn inwieweit die kombinierten Therapien tatsächlich interferieren. Hierfür wurde die (neo-)adjuvante Therapie in einem in-vitro-Kokulturmodell nachgeahmt, indem die Antikörpertherapie entweder mit einem *Anthracyclin (Epirubicin)* oder einem *Taxan (Paclitaxel)* wie folgt kombiniert wurde,

- Targetzellen \pm Anthracyclin/Taxan
- Targetzellen + Trastuzumab \pm Anthracyclin/Taxan
- Targetzellen + Effektorzellen \pm Anthracyclin/Taxan
- Targetzellen + Effektorzellen + Trastuzumab \pm Anthracyclin/Taxan

um den Einfluss auf

- deren *direkte* Zytotoxizität, v. a. aber deren *indirekte* antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
- und *zugrundeliegende Änderungen* auf NK-Zelle-Ebene (Protein- und Zytokinprofil) zu untersuchen.

3. Material und Methoden

3.1. Zelllinien

3.1.1. Targetzellen

Als Zielzelle wurde v. a. die Herceptin-sensible, Her2-überexprimierende Brustkrebszelllinie *BT-474* verwendet, die Lasfargues et al. etablierten. Diese Zelllinie geht auf den soliden Brusttumor einer 60-jährigen, kaukasischen Patientin zurück, dem ein *invasives duktales Karzinom*, der histologisch häufigste Tumortyp der Brust, zugrundeliegt¹¹⁵. Aufgrund eines amplifizierten HER2-Gens überexprimiert diese Zelllinie Her2/neu in einer Dichte von 7×10^5 Her2-Rezeptoren pro Zelle¹¹⁶. Die zwei anderen Zelllinien, die lediglich in einzelnen vergleichenden Untersuchungen eingesetzt wurden, können der nachfolgenden Tabelle entnommen werden. Von besonderer Bedeutung ist dabei, dass die drei verwendeten Zelllinien einerseits in ihrem Her2-Status, andererseits aber auch in ihrer Anti-Her2-AK-Sensitivität divergieren.

Brustkrebs-Zelllinie	Generelle Charakteristika	Her- und Hormon-Rezeptorstatus	Trastuzumab-Sensitivität
BT-474 (ATCC: HTB-20)	<ul style="list-style-type: none"> – Invasives duktales Karzinom (G2/3) – Solider Brusttumor – Human, kaukasisch, ♀, 60 Jahre – 1976, Lasfargues, Coutinho et Redfield¹¹⁵ 	<ul style="list-style-type: none"> – Her2⁺ – EGFR⁺ – ER^{-/+}/PR⁺ 117,118 	+ (sensitiv) ¹¹⁹
JIMT-1 (DSMZ: ACC 589)	<ul style="list-style-type: none"> – Invasives duktales Karzinom (G3, T2N1M0) – Pleuraerguss – Human, ♀, 62 Jahre – 2004, Tanner et al.¹²⁰ 	<ul style="list-style-type: none"> – Her2⁺ – EGFR⁺ – ER/PR⁻¹²⁰ 	- (resistent) ¹²⁰
MDA-MB-453 (ATCC: HTB-131)	<ul style="list-style-type: none"> – Metastasiertes Mammakarzinom – Perikarderguss – Human, kaukasisch, ♀, 48 Jahre – 1976, Cailleau et al.¹²¹ 	<ul style="list-style-type: none"> – Her2^{-/(+)} – EGFR⁻ – ER⁻/PR⁻ 117,118 	- (resistent) ¹¹⁹

Tabelle 2: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Brustkrebszelllinien. ATCC = American Type Culture Collection, DSMZ = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, ER = estrogen receptor, PR = progesterone receptor.

3.1.2. Effektorzellen

Als Effektorzellen fanden zum einen NK-Zellen der Linie *NK3.3*, zum anderen *cord blood(-derived) mononuclear cells CBMC* Verwendung. *NK3.3* wurden über die Aktivierung peripherer Blutlymphozyten (*Mixed Lymphocyte Culture MLC*: responder cell donor [HLA-A3; B7; DR4/A29; Bw57; DR7] x stimulator cell donor [HLA-A2; B7; DR2/A2; Bw7; DR2]) durch Kornbluth et al. gewonnen, denen die Anzucht einer NK-Zell-Kolonie auf Weichagar und deren (Sub-)Kultivierung in IL-2 stimuliertem Flüssigmedium gelang. I. R. ihrer initialen Phänotypisierung charakterisierten Kornbluth et al. diese großen Lymphozyten mit kleinen, exzentrischen Kernen und azurophilen Granula als CD2⁺ (, CD7⁺, CD38⁺, CD45⁺, HLA-DR⁺), CD3⁻, CD4⁻, CD8⁻ (, CD5⁻, CD11b⁻, CD57⁻). Aber nicht nur phänotypisch (CD3⁻, CD16⁺, CD56⁺), sondern auch praktisch erwiesen sie sich als potente *natural killer*, die typischerweise NK-Zell-empfindliche Zielzellen effizient eliminierten (K562, CEM, MOLT-4, HSB-2, BUC, DAUDI). Verglichen mit ihrer starken direkten Zytotoxizität, zeichnet sie eine eher schwache ADCC aus.^{122–124}

Weiterhin wurden für eine Reihe von Versuchen *cord blood(-derived) mononuclear cells CBMC* eingesetzt – *MNCs*, die durch Aufreinigung und Aufarbeitung von *cord blood* von sechs Patientinnen, die gerade entbunden hatten, gewonnen wurden. Neben NK-Zellen fallen u. a. auch Monozyten, B- und T-Lymphozyten darunter.

3.2. Therapeutika

3.2.1. Trastuzumab

- Trastuzumab (*Herceptin*) [2 µg/ml]

Herceptin wurde direkt vom Hersteller Genentech bezogen und der Herstellerempfehlung folgend bei 2-8 °C gekühlt gelagert. Die rekonstituierte Lösung wurde unmittelbar nach Verdünnung auf 2 µg/ml verwendet oder verworfen.

3.2.2. Epirubicin und Paclitaxel

- Epirubicin (*Ellence*) [0,02 µg/ml]
- Paclitaxel (*Taxol*) [0,005 µg/ml]

Sowohl das Anthracyclin als auch das Taxan stellte die Apotheke des Caritas-Krankenhauses St. Josef in Regensburg bereit. Die Therapeutika wurden lichtgeschützt und gekühlt (Epirubicin) bzw. bei Raumtemperatur (Paclitaxel) aufbewahrt. Die Verdünnungsreihen wurden erst am entsprechenden Versuchstag angesetzt und 0,02 µg/ml Epirubicin bzw. 0,005 µg/ml Paclitaxel in die Versuche eingesetzt. Die Zytostatika als auch alle Zytostatika-haltigen Abfälle wurden als sog. gefährliche Abfälle gesondert entsorgt („AS 18 01 08* – Zytotoxische und zytostatische Abfälle“).

3.3. Materialien

Zellkulturmedien	
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	PAA Laboratories, Pasching
RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute)	PAN-Biotech, Aidenbach
Zusätze für die Zellkultur	
FBS (Fetal Bovine Serum)	PAA Laboratories, Pasching
L-Glutamin	PAA Laboratories, Pasching
Phenolrot	Biochrom, Berlin
Penicillin-Streptomycin Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reagenzien und Chemikalien	
BSA (Bovine Serum Albumin)	Biotest, Dreieich
PBS (Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	Merck, Darmstadt
Camptothecin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Serva, Heidelberg
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Methanol	Merck, Darmstadt
NaCl (Natriumchlorid)	Merck, Darmstadt
NaN ₃ (Natriumazid)	Merck, Darmstadt
Pancoll human	PAN-Biotech, Aidenbach
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Türks Lösung	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Gebrauchsfertige Reagenzien/Kits	
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiStop – Fixation/Permeabilization solution (125 ml) – Perm/Wash Buffer (100 ml) – GolgiStop protein transport inhibitor (containing Monensin)	BD Biosciences, Heidelberg
Brilliant Stain Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Lysing Buffer	BD Biosciences, Heidelberg
Puffer und Lösungen	
Annexin-Bindungspuffer 10x	0,1 M HEPES 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ pH 7,4; sterilfiltriert
Einfrriermedium	RPMI-1640 10 % DMSO 10 % FBS
FACS-Puffer	PBS 0,01 % NaN ₃ 0,007 % FBS
MACS-Puffer	PBS 2 mM EDTA 0,5 % BSA
Mausserum	1:100 WT-Mausserum in FACS-Puffer
Fluorochrome	
Annexin V/FITC	ImmunoTools, Friesoythe
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fluorochrom-gekoppelte Antikörper	
anti-human CD3 (IgG1, κ); FITC	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human CD19 (IgG1, κ); PE	BioLegend, San Diego
anti-human CD16 (IgG1, κ); PE	BioLegend, San Diego
anti-human CD27 (IgG1, κ); PE/Cy7	eBioscience, San Diego
anti-human CD33 (IgG1, κ); PerCP	BioLegend, San Diego
anti-human CD56 (IgG1, κ); V450	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human CD137 (IgG1, κ); FITC	eBioscience, San Diego
anti-human Her2/neu (IgG1, κ); PE	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human IFN-γ (IgG1, κ); BV421	BioLegend, San Diego

anti-human NKp46 (IgG1, κ); APC	BD Biosciences, Heidelberg
anti-human Perforin (IgG2b, κ); FITC	eBioscience, San Diego
mouse IgG1, κ Isotype Control; APC	eBioscience, San Diego
mouse IgG1, κ Isotype Control; BV421	eBioscience, San Diego
mouse IgG1, κ Isotype Control; FITC	eBioscience, San Diego
mouse IgG1, κ Isotype Control; PE	eBioscience, San Diego
mouse IgG1, κ Isotype Control; PE/Cy7	eBioscience, San Diego
mouse IgG1, κ Isotype Control; V450	eBioscience, San Diego
mouse IgG2b, κ Isotype Control; FITC	eBioscience, San Diego
Enzyme	
RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA	PAN-Biotech, Aidenbach
Interleukine	
rh IL-2	ImmunoTools, Friesoythe
Verbrauchsgegenstände	
Deckgläser	Engelbrecht Medizin- & Labortechnik, Edermünde
Kryoröhrchen (Polypropylen; 1 ml, 2 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Mikrotiterplatten, Falcon (6-Well)	Corning Life Sciences, Corning
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Pipettenspitzen, Combitips advanced (5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße, Safe-Lock-Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Rundbodenröhrchen, Falcon (Polystyrol; 5 ml)	Corning Life Sciences, Corning
Zentrifugenröhrchen (Polypropylen; 15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 125 cm ²)	Greiner Bio-One, Kremsmünster
Geräte	
Einkanalpipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)	BRAND, Wertheim
Mehrfachdispenser, Multipipette M4	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe, pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Reagenzglasschüttler, REAX 2000	Heidolph Instruments, Schwabach
Schüttelwasserbad, GFL 1083	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel
Wasseraufbereitungssystem, Milli-Q UF Plus	Millipore, Molsheim
Zählkammer, nach Neubauer	Menzel Glasbearbeitungswerk, Braunschweig
Zellzähler, Scepter 2.0 Cell Counter	Merck, Darmstadt
Sterilwerkbänke	
Heraeus Laminair HBB 2472 S	Heraeus, Hanau
Primär-Sterilbank	Heraeus, Hanau
Brutschränke	
BBD 6220	Heraeus, Hanau
Heraeus 6000	Heraeus, Hanau

Kühl- und Gefriergeräte	
Einfrühilfe, Qualifreeze	LabWare, Wilmington
Gefrierschrank -20 °C	Colora Messtechnik, Lorch
Gefriertruhe -80 °C, E 80-360 T	Colora Messtechnik, Lorch
Kühlschrank +4 °C, KU 1503-5	Liebherr, Bulle
Zentrifugen	
Biofuge pico	Heraeus, Hanau
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Megafuge 1.0R	Heraeus, Hanau
Rotina 380R	Hettich, Tuttlingen
Varifuge 3.2RS	Heraeus, Hanau
Mikroskope	
AxioCam MRc	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Axiovert 200	Carl Zeiss Microscopy, Jena
Labovert F	Leitz, Wetzlar
Magnetic-Activated Cell Sorting (MACS)	
Anti-ErbB-2 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD34 MicroBead Kit, human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MS Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS)	
BD FACSCanto II Flow Cytometry System	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACSThe Sheath Fluid	BD Biosciences, Heidelberg
BD FACS Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Software	
Adobe Illustrator	Adobe Systems, San José
Zeiss ZEN	Carl Zeiss Microscopy, Jena
BD FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo	Tree Star, Ashland
GraphPad Prism	GraphPad Software, San Diego
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond
ModFit LT	Verity Software House, Topsham

3.4. Theoretische Grundlagen

3.4.1. Durchflusszytometrische Fluoreszenzanalytik

Die zentrale Untersuchungsmethode dieser Arbeit stellte die Durchflusszytometrie (= *fluorescence-activated cell sorting* oder *scanning FACS^G*) dar. Sie dient der quantitativen Analyse von Partikeln bzw. einzelnen Zellen (0,2-20 μm), die in einem Flüssigkeitsstrom in hohem Tempo untersucht werden können. Das Verfahren, das die zeitgleiche Messung mehrerer Parameter – wie z. B. die Expression diverser Antigene – erlaubt, beruht darauf, dass durch Licht exziterte Zellen dieses streuen oder selbst solches emittieren, wenn sie zuvor mit Fluorochromen oder Fluorochrom-gekoppelten AK beladen wurden.

Für die Versuche wurde dabei das Gerät FACSCanto II des Herstellers BD Biosciences genutzt, dessen analytische Apparatur sich in ein Flüssigkeits-, ein optisches und ein elektronisches System gliedert, die im Folgenden angelehnt an das BD FACSCanto Flow Cytometer Reference Manual¹²⁵ und das Standardwerk der Durchflusszytometrie von Sack, Tárnok und Rothe¹²⁶ erläutert werden:

3.4.1.1. Flüssigkeitssystem (fluidics system)

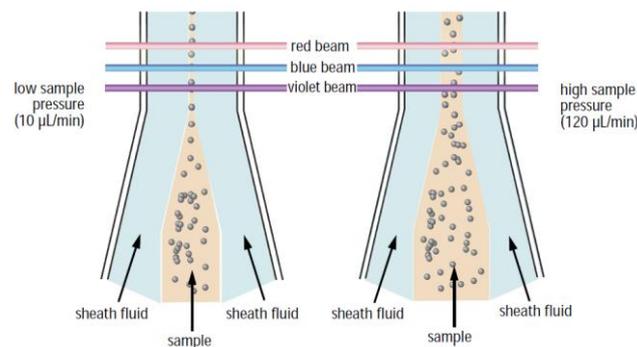


Abbildung 8: Hydrodynamische Fokussierung des Probenstromes im Hüllstrom. [aus BD Biosciences¹²⁵] Links: Durch einen niedrigen Probedruck nimmt die Breite des Probenflusses ab, dadurch sind die Zellen mehr in einer Linie. Die Messdaten sind präziser, die Messzeit ist aber länger (DNA-Zellzyklusanalysen). Rechts: Durch einen hohen Probedruck nimmt die Breite des Probenflusses dagegen zu, dadurch sind die Zellen wiederum weniger in einer Linie. Die Messzeit wird kürzer, die Messdaten aber auch unpräziser (Phänotypisierungen).

Die in Suspension schwimmenden Zellen werden mittels eines speziell konzipierten Flüssigkeitssystems „vereinzelt“. Dies gelingt in einer Durchflusszelle bzw. -küvette. Die zu untersuchende Zellsuspension wird in eine Kapillare eingesogen und über diese zentriert in einen Hüllstrom injiziert, der kontinuierlich durch die Durchflusszelle fließt („*stream in stream*“). Dieser Hüllstrom reißt den Probenstrom mit, die beiden Ströme verwirbeln aber nicht, sondern strömen laminar. In der konischen Küvette werden sie immer mehr eingengt und infolge enorm beschleunigt. Hierdurch wird der Probenstrom zunehmend zum Zentrum der Küvette verjüngt und die Suspension in eine Sequenz von Einzelzellen gezwungen. Die Zellen werden so in Reih und Glied an den Messpunkten der Durchflusszelle vorbeigeführt (*Hydrodynamische Fokussierung*, vgl. Abb. 8).

^G Das Akronym FACS steht streng genommen für *fluorescence-activated cell sorting*, wurde aber im allgemeinen Gebrauch auch auf das *scanning* ausgedehnt.

3.4.1.2. Optisches System (optics system)

Die Optik gliedert sich in zwei Komponenten, eine Anregungs- und eine Detektionseinheit (vgl. Abb. 9):

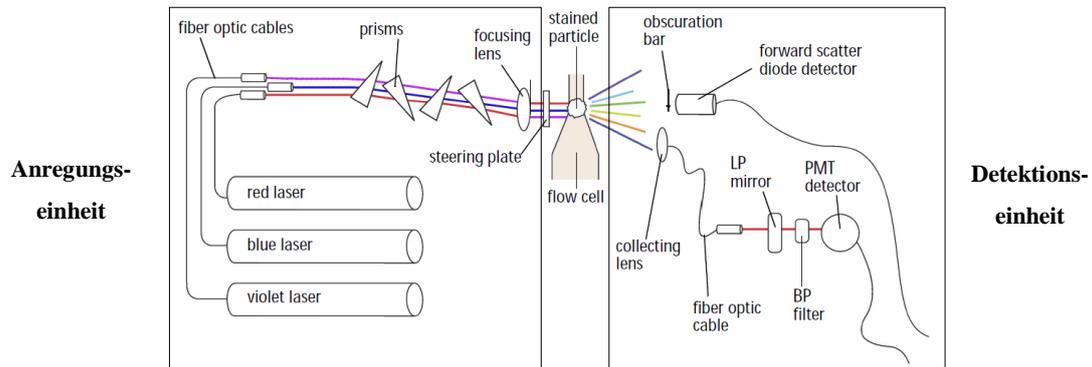


Abbildung 9: Lichtweg im BD FACS Canto II. [modifiziert nach BD Biosciences¹²⁵]

Anregungseinheit

Als anregende Lichtquelle fungieren drei luftgekühlte Laser, die in verschiedenen Ebenen eingekoppelt sind. Ihr emittiertes Licht wird durch eine Kette von Prismen und Linsen geformt und im Messpunkt, wo es die Zellen senkrecht trifft, fokussiert.

Die getroffene Zelle streut dieses Lichtbündel v. a. in Abhängigkeit ihrer Größe und Granularität. Das auftreffende Licht wird in alle Richtungen, jedoch zu einem großen Teil in einem engen Winkel zum Lichtbündel (*Vorwärtsstreulicht, Forward Scatter FSC*) und zu einem kleineren Teil zu den Seiten gestreut (*Seitwärtsstreulicht, Side Scatter SSC*). Das Forward Scatter-Signal FSC (1,5-10°) entspricht hierbei grob der Größe der Zelle, während das schwächere Side Scatter-Signal SSC (90°) deren Granularität bzw. Binnenstruktur beschreibt.

Durchtreten die Einzelzellen den Fokus, werden zudem ggf. gekoppelte Fluorochrome exzitert. Absorbieren sie einzelne Photonen, werden ihre Elektronen im energetischen Niveau angehoben und emittieren bei Rückkehr in ihr Grundniveau einen diskreten Teil der Energiedifferenz erneut in Form von Photonen. Sie senden energieärmeres, langwelligeres Licht aus (*Stokes Shift*), d. h. sie fluoreszieren selbst kurzzeitig. Die Photonenkonzentration ist dabei proportional zur gebundenen Fluorochrom-Menge. Um die Fluoreszenzen gegeneinander abgrenzen zu können, müssen daher Fluorochrome gewählt werden, die sich in ihren Emissionslinien hinreichend unterscheiden.

Fluorochrom	Anregungswellenlänge [nm]	Exzitationsmaximum [nm]	Emissionsmaximum [nm]	Langpass-Filter LP	Bandpass-Filter BP	PMT-Position
BV421	405	407	421	-	450/50	B
V450	405	404	448	-	450/50	B
DAPI	405	358	461	-	450/50	B
FITC	488	494	520	502	530/30	E
PE	488	496	578	556	585/42	D
PerCP	488	482	678	655	670	B
PE/Cy7	488	496	785	735	780/60	A
APC	633	650	660	-	660/20	C

Tabelle 3: Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome. [Exzitations- und Emmisionsmaxima entsprechend der Angaben von BD Biosciences¹²⁷⁻¹²⁹]

Detektionseinheit

Eine komplexe Detektionseinheit, bestehend aus einer Photodiode und mehrere Photoröhren, registriert das von den Zellen gestreute bzw. emittierte Licht und übersetzt die detektierten Photonen in elektronische Pulse, die in ihrer Höhe mit dem optischen Input korrelieren. Die Photodiode fängt das FSC-Signal axial zum Anregungslicht ab und wandelt es. Die schwächeren Signale – SSC und Fluoreszenzen – werden hingegen von sensitiveren Photoröhren, den *Photomultiplier Tubes (PMTs)*, konvertiert und in einer Kette von Elektroden, den *Dynoden*, potenziert. Ihre Sensoren sind orthogonal zum exzitierenden Lichtbündel orientiert. Die Photomultiplier Tubes sind im Modell FACSCanto II 4-2-2 konfiguriert, d. h. in der zum blauen Laser gehörenden Detektionseinheit sind fünf PMTs in einem Oktagon angeordnet, in den Detektionseinheiten des violetten bzw. roten je drei PMTs zu Trigonon gruppiert. Das erlaubt die Analyse von bis zu achtfach gefärbten Assays, da durch diese Konstruktion vier vom Blaulicht angeregte Fluoreszenzen und je zwei vom roten bzw. violetten Licht exziterte Emissionsspektren zeitgleich detektiert werden können. Licht, das via Glasfaserkabel in die drei- bzw. achteckige Anordnung einfällt, trifft zunächst auf diverse dichroitische Spiegel bzw. Interferenzfilter. Sie sollen die Photonen „sortieren“ und zu den korrekten Detektoren schleusen, indem sie die Fluoreszenzen sukzessiv in Spektren zerlegen. Zwei Sorten von Filtern finden hierfür Verwendung: *Langpassfilter (cut-off Filter)* und *Bandpassfilter (cut-in Filter)*. Langpassfilter als Kantenfilter definieren einen konkreten Grenzwert. Kürzere Wellen werden geblockt, während Licht längerer Wellenlänge den Filter weitgehend ungehindert durchqueren kann. Bandpassfilter hingegen legen keinen fixen Frequenzwert, sondern ein Frequenzband fest und „fenstern“ Licht, indem sie solches höherer wie niedrigerer Frequenz sperren. Diese Filter (z. B. 780/60) werden durch ihren geometrischen Mittelwert ($\lambda = 780 \text{ nm}$) und die Bandbreite, über die sie durchlässig sind (60 nm: 750-810 nm), beschrieben. Im Achteck angelangt trifft vom blauen Laser angeregtes Licht so initial auf einen Langpassfilter. Dieser erste LP-Filter mit einem Grenzwert von 735 nm lässt Licht längerer Wellenlänge zum ersten PMT (*PE/Cy7*) passieren, wohingegen kürzere Wellen reflektiert und zum zweiten PMT (*PerCP*) weitergelenkt werden. Vor diesem zweiten PMT ist ein weiterer LP-Filter positioniert, der die Photonen in gleicher Weise selektiert. Auf diese Weise leitet die achteckige Anordnung das Licht des jeweiligen Fluorochroms zu seinem spezifischen Photomultiplier, denn die PMTs selbst sind „farbenblind“. Bandpassfilter unmittelbar vor den PMTs schirmen unerwünschte Spektrallinien weiterhin ab.

Laser	Emissionslinie [nm]	Parameter	Detektionseinheit	LP-Filter (1.)	BP-Filter/ LP-Filter (2.)	PMT / potentielle Fluorochrome
Diodenlaser	405 (violett)	1	Trigonon	502	510/50	A AmCyan
		2		-	450/50	B V450
Feststofflaser	488 (blau)	3	Oktagon	735	780/60	A PE/Cy7
		4		655	670	B PerCP
		-		610	-	C -
		5		556	585/42	D PE
		6		502	530/30	E FITC
		SSC		-	488/10	F -
		-		-	-	G -
		-		-	-	H -
He-Ne-Laser	633 (rot)	7	Trigonon	735	780/60	A APC/Cy7
		-		-	685	B -

		8		-	660/20	C	APC
--	--	---	--	---	--------	---	-----

Tabelle 4: Übersicht über das optische System des BD FACS Canto II. [modifiziert nach BD Biosciences^{130,131}]

3.4.1.3. Elektronisches System (electronics system)

Kompensation

Doch selbst durch diese komplex konstruierte Filterreihe kann keine perfekte Trennung des einfallenden Lichtstrahls in seine einzelnen Emissionslinien und somit keine eindeutige 1:1 Zuweisung zum spezifischen Detektor erreicht/erzielt werden. So detektieren die Photoröhren, die eigentlich für ein diskretes Spektrum spezifisch sein sollten, jeweils auch Anteile angrenzender ähnlicher Wellenlängen. Von einer monochrom-konjugierten Zelle (*PE*) emittiertes Licht erregt so nicht nur „ihren“ spezifischen Detektor (*PE-PMT D*), sondern evtl. weitere Photoröhren (*FITC-PMT E*). Eine Setup-Messung mit un- und einfach gefärbten Zellen half, derartige Überlappungen durch Fehlanregung „fremder“ Detektoren vor Multicolor-Messungen aufzudecken, die dann entsprechend elektronisch kompensiert werden konnten (Subtraktion spektral falscher Signale). Zu diesem Zweck sind in die *FACSDiva-Software* auch automatische Algorithmen implementiert, die individuell korrigiert werden können.

Signalprozessierung

Für die Messungen wurde weiterhin ein elektronisches *Threshold Level* definiert, um unterschwellige, störende Pulse – Zelldebris oder den elektronischen Hintergrund – zu diskriminieren. Der Schwellenwert bezieht sich auf einen definierten Parameter, den Triggerparameter. Für die vorliegenden Versuche wurde über FSC – die grobe Größendimension der Ereignisse – diskriminiert, ergo nur Events einer gewissen Größe prozessiert. Für jeden Puls jenseits des Schwellenwertes generieren die Pulsprozessoren hingegen ein Profil über dessen Höhe, Fläche und Weite, das für jedes Ereignis einzeln gespeichert wird: Die *Höhe (height)* bildet die Intensität des Pulssignals ab, die *Fläche (area)* das Integral des Pulssignals über die Zeit (\approx *Korrelat der an den Partikel gebundenen Fluorchrommenge*) und die *Weite (width)* deren Verhältnis errechnet nach der Formel $area/height \times 6400$ (\approx *Korrelat der Partikelgröße*).

Signalverstärkung

Die Signale wurden linear (FSC, SSC) oder logarithmisch (Fluoreszenz) verstärkt, wobei sich die Wahl wesentlich durch die Weite des Messbereichs begründete. Für Untersuchungen mit engem Messbereich wurde eine lineare Auftragung gewählt (Zellzyklusanalysen), für Messungen mit weitem Wertebereich eine dekadisch logarithmische Darstellung (Phänotypierungsanalysen). Ein Analog-Digital-Wandler digitalisierte die Signale, die an die Software übermittelt wurden.

Standardsoftware

Die Steuerung der Instrument-Funktionen wie die Erhebung der durchflusszytometrischen Messungen erfolgte unter Nutzung der *FACSDiva Software*. Gespeichert wurden die digitalisierten Daten im standardisierten *FCS 2.0/3.0 (Flow Cytometry Standard FCS)*-Format, wo die Messwerte Zelle für Zelle in einer eigenen Werteliste hinterlegt und die Messeinstellungen im Dateiheder konserviert sind. Für die Zellzyklusverteilungsmessungen wurde zudem die *ModFit LT Software* zu Hilfe genommen.

Datendarstellung und Datenverarbeitung

In einem ersten Schritt wurden die Messereignisse jeweils eingegrenzt, indem Zelldebris und -dubletten elektronisch eliminiert wurden, um lediglich lebende, einzelne Zellen einzubeziehen. Zur Diskriminierung von Zelltrümmern und -klumpen wurde in einem *Dot-* oder *Density-Plot* initial die „Größe“ (FSC-A-Signal: x-Achse) gegen die „Granularität“ (SSC-A-Signal: y-Achse) aller gemessenen Events aufgetragen. Zelltrümmer liefern hier falsch schwache Signale, Zelldubletten hingegen zu hohe Werte. Durch Definieren einer entsprechenden Region wurden diese Ereignisse exkludiert. Die Diskriminierung koinzidenter Ereignisse ist insbesondere i. R. der statischen DNA-Analysen essentiell, denn Dubletten mit doppelter Fluoreszenzhöhe fingieren Einzelzellen mit 4n: tetraploide oder sich in der G₂-Phase befindende diploide Zellen. Ihre Diskriminierung gelingt im SSC/FSC-korrelierenden Dot-Plot nur grob. Ein Diagramm, das die beiden pulsprozessierten Werte – Weite W (Abszisse) und Fläche A (Ordinate) – in Beziehung bringt, identifizierte diese irritierenden Zelldubletten und -aggregate, die im ersten eingegrenzten Bereich (R1) „übersehen“ wurden. Koinzidente Zellen durchqueren den Querschnitt des Lichtbündels nämlich langsamer als Einzelzellen. Infolge weisen sie einen größeren Weitenwert auf, da dieser die Signaldauer spiegelt und kommen so rechts der G₁/G₂-Einzelzellen zum Liegen. Durch Demarkation einer weiteren Subpopulation (R2) wurde so sichergestellt, nur die interessierenden Zellen in die definite Analyse miteinzubeziehen (vgl. Abb. 10).

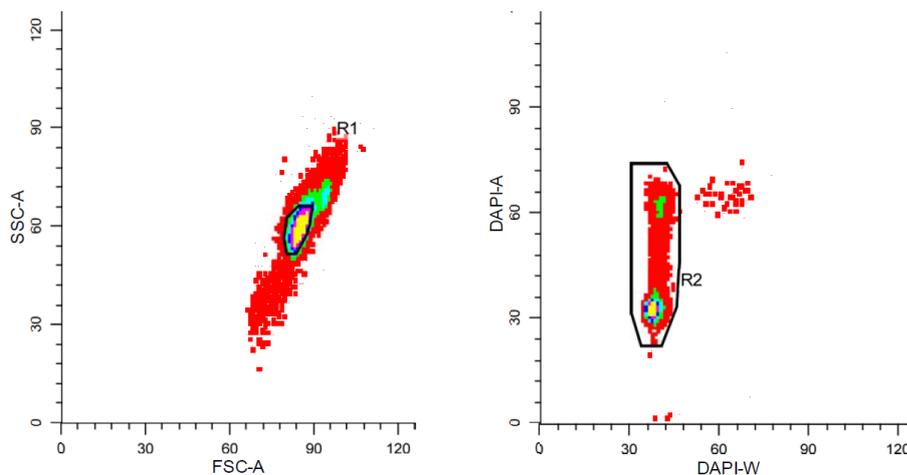


Abbildung 10: Gating-Strategie bei der Bestimmung der statischen S-Phase-Fraktion. [Originalbilder] Links: Gating-Strategie zur Eliminierung von Zelldebris. Rechts: Gating-Strategie zur Eliminierung von Zelldubletten.

Bei Betrachtung *eines* Parameters wurde die Häufigkeitsverteilung in einem Histogramm festgehalten (Auftragung der Intensität *eines* gemessenen Signals auf der x-Achse gegen die Zahl der Zellen mit der jeweiligen Intensität des gemessenen Signals auf der y-Achse). Wurden dagegen *zwei* Parameter korreliert, bildete ein Dot- oder Density-Plot die Korrelationsverteilung ab (Intensität *eines* gemessenen Signals auf der x-Achse gegen die Intensität *eines anderen* gemessenen Signals auf der y-Achse).

- **Einparametrische Darstellung/Einparameterdarstellung:** **Histogramm**
- **Zweiparametrische Darstellung/Zweiparameterdarstellung:** **Dot- oder Density-Plot**

Ehe die einzelnen Versuche bzw. Versuchsreihen beschrieben werden, wird im Folgenden kurz der Theorie vorgegriffen, die den drei durchflusszytometrischen Untersuchungen zugrunde liegt, die hier v. a. Verwendung fanden: die *Analyse 1.) der statischen S-Phase-Fraktion*, *2.) der Apoptose-Fraktion* und *3.) die Phänotypisierung von Zellen*.

3.4.2. Zellzyklus-Analyse mittels Durchflusszytometrie

Um die Proliferationsaktivität der (Tumor-)Zellen in Abhängigkeit der drei Therapeutika bzw. deren Konzentration beurteilen zu können, wurde u. a. die prozentuale Verteilung der Zellen über den Zellzyklus durchflusszytometrisch untersucht.

Der Zellteilungszyklus gliedert sich grob in die eigentliche Teilungs- (*M-Phase*), der eine deutlich längere Vorbereitungsphase (*Interphase*) – aufgeteilt in eine G_1 -, S- und G_2 -Phase – vorangeht. Entscheidendes Ereignis zwischen zwei Teilungen stellt dabei v. a. die S(ynthese)-Phase dar, in der die DNA repliziert wird. Die vor- (G_1) wie nachgeschaltete (G_2) Gap-Phase dient dabei der Vor- bzw. Nachbereitung wie z. B. der Reparatur von Replikationsfehlern. Ein Teil (terminal) differenzierter Zellen tritt aber auch (aus der G_1 -heraus) in die G_0 -, eine Ruhephase, ein. Diese quieszenten Zellen nehmen nicht (mehr) an der Teilung teil. Durchflusszytometrisch gelingt die Untersuchung der Zellzyklusverteilung unter Verwendung DNA-interkalierender Fluorochrome wie (hier) *DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)*, das bevorzugt an AT-reiche Regionen der kleinen Furche der DNA bindet. Da sich DAPI stöchiometrisch an die DNA anlagert, verhält es sich proportional zum DNA-Gehalt, der Phasen-abhängig ist: zwei Chromosomensätze in der G_0 -/ G_1 -Phase ($2n = \text{diploid vor der DNA-Replikation}$), zwei bis vier in der S-Phase ($2-4n \text{ während der Replikation}$) und vier in der G_2 -/M-Phase ($4n = \text{tetraploid nach der DNA-Replikation}$). Die gebundene Fluorochrom-Menge spiegelt somit indirekt die „Position“ der Zelle bzw. der Zellen eines Zellverbundes im Zellzyklus wider. Durch Auftragung des DNA-Gehaltes gegen die Anzahl an gemessenen Ereignissen kann dann die prozentuale Verteilung der Zellen über den Zellzyklus visualisiert werden (vgl. Abb. 11). In dem DNA-Diagramm mit (i. d. R.) zwei Peaks entspricht ersterer den Zellen in der (G_0 -)/ G_1 -Phase mit $2n$, letzterer den Zellen in der G_2 -/(M-)Phase mit $4n$, deren Differenzierung – G_0 - vs. G_1 - oder G_2 - vs. M-Phase – erlaubt der DNA-Gehalt alleine aber nicht. Die Senke zwischen beiden Peaks bildet die statische S-Phase-Fraktion mit $2-4n$ ab, die als Parameter der Proliferationsaktivität herangezogen wird.¹³²

- **1. Peak:** **G_0 -/ G_1 -Phase-Fraktion ($2n$, haploid)**
- **zw. 1. und 2. Peak:** **S-Phase-Fraktion ($2-4n$)**
- **2. Peak:** **G_2 /M-Phase-Fraktion ($4n$, diploid)**

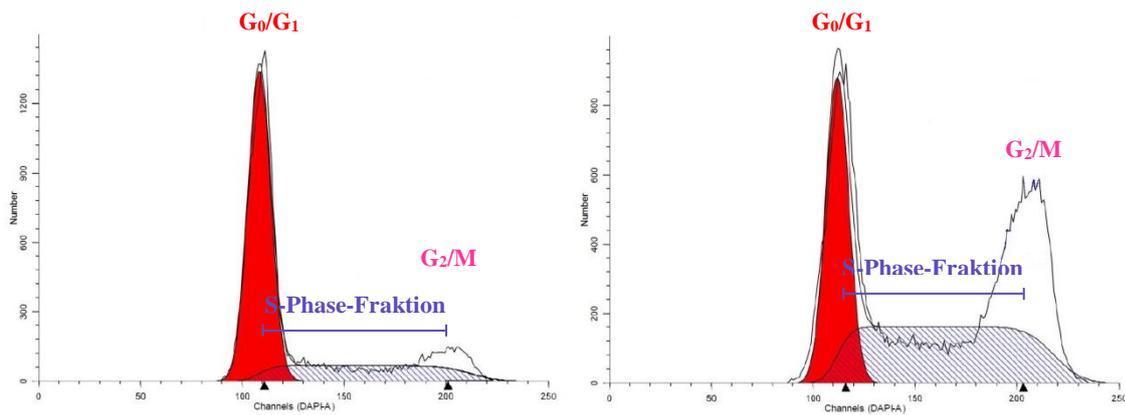


Abbildung 11: Zwei Zellzyklus-Analysen, die in ihrer Verteilung über die G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase divergieren. [Originalbilder] Links: BT-474 nach 48 h ohne Behandlung. Rechts: BT-474 nach 48 h Paclitaxel-Behandlung [0,05 µg/ml]. Paclitaxel wirkt phasenspezifisch auf Zellen in der M-Phase, indem es mit den für die Mitosespindeln essentiellen Mikrotubuli interferiert. Letztlich resultiert ein Mitoseblock. Die DNA-Histogramme spiegeln das Dosis-abhängige „Auflaufen“ der Zellen auf die M-Phase wider.

3.4.3. Apoptose-Analyse mittels Durchflusszytometrie

V. a. wurden die Effekte der Behandlungen wie auch deren Effekt auf die direkte wie indirekte Killing-Aktivität der NK-Zellen aber an der Apoptoserate bemessen, die durchflusszytometrisch mittels eines Annexin V/FITC-Assays bestimmt wurde. Denn die drei Therapeutika als auch die NK-Zellen triggern in den Targetzellen Apoptose.

Apoptose und Nekrose werden für gewöhnlich als konträre Zelltodkonzepte gegenübergestellt: Nekrose, auch als *accidental cell death (ACD)* bezeichnet, tritt infolge einer irreversiblen gravierenden Beeinträchtigung ein. Sie stellt ein pathologisches Phänomen – einen traumatischen Tod – dar. Es resultiert eine Zellschwellung (*Onkose*) und letztlich -lyse. Beim *programmed cell death (PCD)* handelt es sich dagegen um physiologische Prozesse wie die Apoptose, i. R. derer die Zelle schrumpft (*Pyknose*), um sich in kleine Vesikel, die *apoptotic bodies*, zu zerschneiden. Am Anfang der Apoptosekaskade orientieren sich einzelne Phospholipide der Doppellipid-umhüllten Zelle um – wie *Phosphatidylserin (PS)*, welches wenn externalisiert als *eat-me Signal* für „Fresszellen“ fungiert.

PS ist i. d. R. auf der Innenseite lokalisiert, transloziert aber als eines der ersten Ereignisse der Apoptose auf die Außenseite der Zelle. Dies nutzt der Annexin V/FITC-Assay methodisch. Denn Annexin V bindet Ca²⁺-abhängig affin an dieses Phospholipid. Gekoppelt mit einem Fluorochrom wie (hier) *FITC (Fluoresceinisothiocyanat)* können auf diese Weise PS bzw. PS-exponierende Zellen, d. h. „sterbende“ (früh-apoptotische) oder „tote“ (spät-apoptotische/nekrotische) Zellen, durchflusszytometrisch detektiert werden. Annexin V/FITC alleine erlaubt aber nicht deren Unterscheidung. Um auch diese gegeneinander abgrenzen zu können, muss mit einem zweiten Fluorochrom wie *DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)*, welches bei kurzer Färbedauer nur in perforierte (spät-apoptotische bis nekrotische) Zellen eindringen kann, gegengefärbt werden. Durch die kombinierte Färbung können dann wie folgt differenziert werden (vgl. Abb. 12):¹³³

- **Annexin V⁻, DAPI:** **vitale Zellen**
- **Annexin V⁺, DAPI:** **früh-apoptotische Zellen**
- **Annexin V⁺, DAPI⁺:** **spät-apoptotische Zellen/nekrotische Zellen**

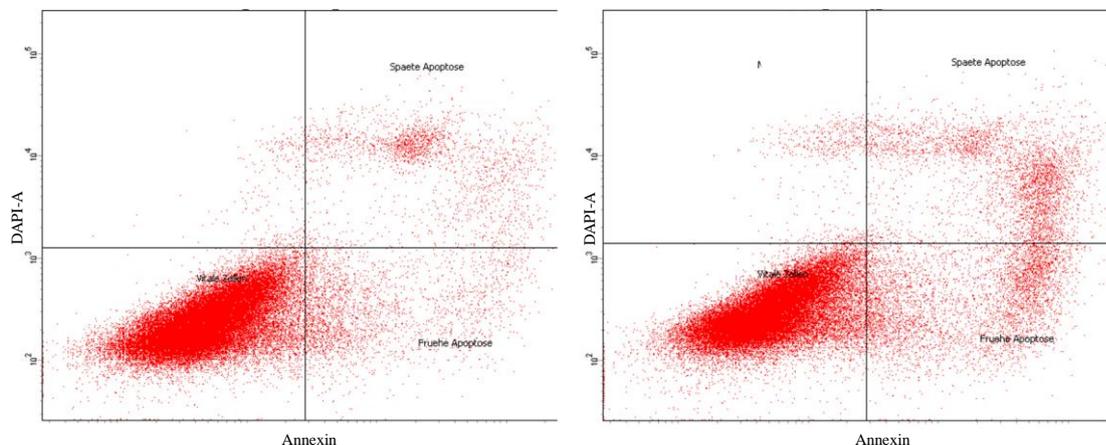


Abbildung 12: Zwei Apoptose-Analysen, die in der Höhe ihrer Apoptose-Fraktion differieren. [Originalbilder] Links: SK-BR-3 nach 24 h ohne Behandlung. Rechts: SK-BR-3 nach 24 h Epirubicin-Behandlung [0,1 µg/ml].

3.4.4. Phänotypisierung mittels Durchflusszytometrie

Neben den Auswirkungen der Antikörper-basierten Therapieregime auf die Killing-Aktivität der NK-Zellen interessierten aber auch die auf deren Phänotyp. Um therapieabhängige Änderungen auf Ebene der Oberflächenantigene aufzudecken, wurden die NK-Zellen deshalb phänotypisiert. Mittels Multicolor-Durchflusszytometrie wurde die (differentielle) Expression fünf distinkter CD-Moleküle untersucht (vgl. Abb. 13). Über den natürlichen Zytotoxizitäts-Rezeptor NKp46 erfolgte im 1.) *ersten Schritt* deren Linien-spezifisierung, über die übrigen CD-Moleküle im 2.) *zweiten Schritt* eine Subgruppendifferenzierung. Neben dem Differenzierungs- reflektieren die Expressionsprofile auch deren Aktivierungsgrad:

CD-Antigen	Synonyme	Bedeutung auf NK-Zellen
1.) CD335	– NKp46 – NCR1	– in die Zielzellerkennung und -eliminierung involviert – NK-Zell-spezifisch, konstitutiv von NK-Zellen exprimiert ^H (vgl. auch Kap. 1.3.1.2.)
2.) CD56	– NCAM1	– in die Motilität, Migration und Entwicklung der NK-Zellen involviert – CD56^{bright} CD16^{dim} NK-Zellen (vgl. auch Kap. 1.3.): sekretorische Aktivität ↑, zytotoxische Aktivität ↓ (Perforin-/Granzym B-Granula ↓); v. a. in sekundären lymphatischen Organen (Homing-Rezeptoren ⁺)
2.) CD16	– FcγRIIIA	– Fcγ-Rezeptor IIIA, der die ADCC vermittelt – CD56^{dim} CD16^{bright} NK-Zellen (vgl. auch Kap. 1.3. und Kap. 1.3.1.2.): sekretorische Aktivität ↓, zytotoxische Aktivität inkl. ADCC ↑ (Perforin-/Granzym B-Granula ↑); v. a. im peripheren Blut
2.) CD27	– TNFRSF7	– CD27⁺ (CD56^{dim/bright}) NK-Zellen : sekretorische Aktivität ↑, zytotoxische Aktivität ↓ (Perforin-/Granzym B-Granula ↓); kleiner Teil der NK-Zellen im peripheren Blut, aber größerer Teil der NK-Zellen im Nabelvenenblut sowie der NK-Zellen in primären/sekundären lymphatischen Organen

^H CD335 (NKp46) ist – anders als der klassische NK-Zell-Marker CD56 – NK-Zell-spezifischer sowie sensitiver. Denn CD56 wird zum einen nicht nur von NK-Zellen und zum anderen auch nicht von allen NK-Zellen exprimiert (bzw. hoch- oder herunterreguliert).

		<ul style="list-style-type: none"> - CD27(überwiegend $CD56^{dim}$) NK-Zellen: sekretorische Aktivität ↓, zytotoxische Aktivität ↑ (Perforin-/Granzym B-Granula ↑); größter Teil der NK-Zellen im peripheren Blut^{134,135}
2.) CD137	<ul style="list-style-type: none"> - TNFRSF9 - 4-1BB 	<ul style="list-style-type: none"> - inhibitorischer Rezeptor auf <i>humanen</i>, aber aktivierender Rezeptor auf <i>murinen</i> NK-Zellen (↔ ko-stimulierend auf <i>T-Zellen</i>) - CD137L-CD137 Interaktion auf <i>humanen</i> NK-Zellen: Proliferation der NK-Zellen ↑, sekretorische Aktivität (IFN-γ) ↓, zytotoxische Aktivität ↓ - CD137L-CD137 Interaktion auf <i>murinen</i> NK-Zellen: Proliferation der NK-Zellen ↑, sekretorische Aktivität (IFN-γ) ↑, zytotoxische Aktivität ↔/↑¹³⁶⁻¹³⁹

Tabelle 5: Übersicht über die in dieser Arbeit analysierten CD-Antigene zur Diskriminierung und Differenzierung der untersuchten NK-Zellen. ↑ = hoch, ↓ = niedrig, NCR1 = natural cytotoxicity triggering receptor 1, NCAM1 = neural cell adhesion molecule 1, FcγRIIIA = Fcγ receptor IIIA, TNFRSF7 = tumor necrosis factor receptor superfamily member 7, TNFRSF9 = tumor necrosis factor receptor superfamily member 9.

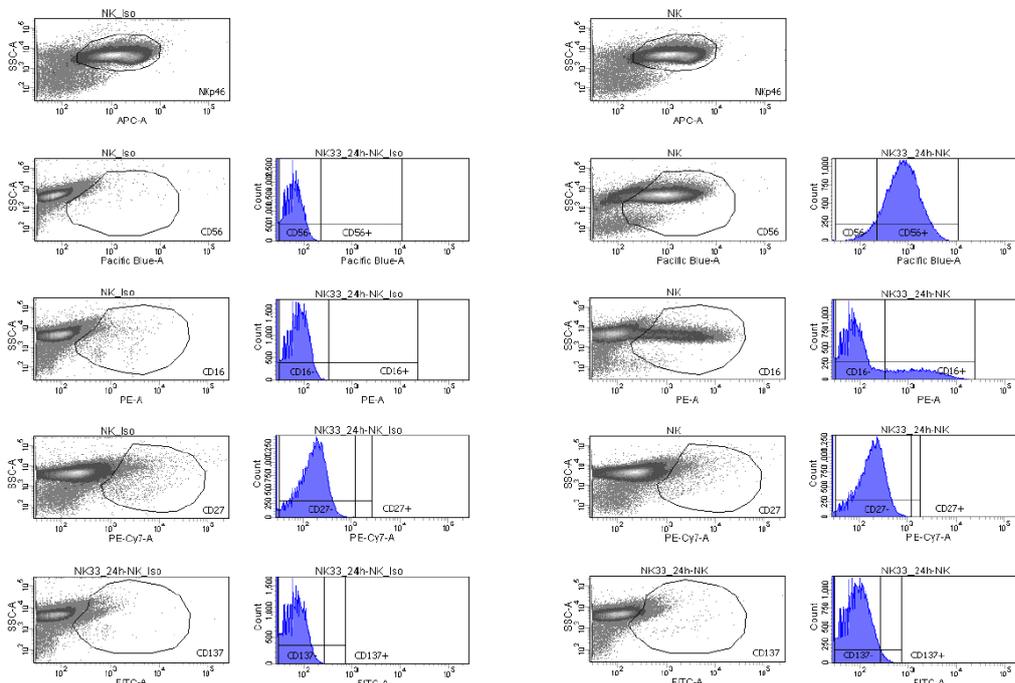


Abbildung 13: Phänotypisierung der (NKp46⁺) NK-Zellen der Linie NK3.3 anhand der CD-Antigene CD16, CD56, CD27 und CD137. [Originalbilder] Links: Isotypkontrolle. Rechts: Färbung.

Um die Frequenz (%) der CD-positiven Ereignisse zu ermitteln, wurden vier Density-Plots angelegt, die die vier Fluoreszenzen mit den SSC-Werten korrelierten. Rechts der Isotypkontrolle wurde ein Polygon positioniert, in dem sich < 1 % der Isotypkontroll-Ereignisse befanden. Die Ereignisse der Positivprobe (≈ Zellen), die in die Grenzen dieser definierten Region fielen, wurden „CD-positiv“ gewertet und in % der NKp46⁺ Ereignisse (≈ NK-Zellen) angegeben. Neben den Density-Plots wurde jeweils die Fluoreszenz gegen die Zahl der Ereignisse aufgetragen. Ein erstes „CD“-Gate grenzte die Verteilungskurve der Isotypkontrolle, ein zweites „CD“-Gate, rechts des ersten Gates orientiert, die „positive“ Kurve ein. Die Fluoreszenzintensitäten wurden dann zum einen anhand der *mean fluorescence intensity (MFI)*, zum anderen anhand des *stain index (SI)* beurteilt. Die MFI gibt die „*brightness*“ des positiven Peaks an, wohingegen der SI nicht nur den positiven, sondern auch den negativen Peak einbezieht, da dessen Berechnung sowohl die Distanz (*distance, D*) zwischen positivem und negativem Peak als auch die Weite (*width, W*) des negativen

Peaks berücksichtigt ($SI = D/W = [MFI_{\text{positiv}} - MFI_{\text{negativ}}]/2 \times SD_{\text{negativ}}$). Der SI gibt also das auf das Hintergrund-Signal „normalisierte“ Fluoreszenz-Signal wieder.

3.5. Methoden der Zellkultur und -präparation

3.5.1. Standardkultur

Alle Arbeitsschritte der Standardkultur wurden steril unter der Sicherheitswerkbank durchgeführt, um durch aseptische Arbeitsweise einer Kontamination der Kulturen vorzubeugen. Die Arbeitsfläche wurde mit 70%igem Alkohol ausgewaschen, die Abfälle durch Autoklavieren inaktiviert.

3.5.1.1. Kultivierung der Tumorzellen

Die eingesetzten Brustkrebszelllinien zeichnen sich durch ein adhärentes Wachstum aus. Sie wurden in Gewebe-Kulturflaschen der Größe T25 - T75 bei 37 °C, 0,5 % CO₂, 20 % O₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ihr Kulturmedium, DMEM (BT-474, JIMT-1) bzw. RPMI-1640 (MDA-MB-453) mit 0,2 % Phenolrot und 5 % FBS, wurde im Zyklus von zwei Tagen erneuert. Bei Erreichen einer 80%igen Konfluenz wurden die Tumorzellen subkultiviert.

3.5.1.2. Kultivierung der Immunzellen

Die Immunzellen (NK3.3, CBMC) als Suspensionszellen wurden unter denselben Bedingungen wie die Tumorzelllinien im Inkubator kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde für die Immunzellen RPMI-1640 mit 0,2 % Phenolrot und HEPES, ergänzt um 1 % Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 15 % FBS, verwendet. Weiterhin wurden die Immunzellen mit 200 IU/ml rh IL-2 stimuliert.

3.5.1.3. Subkultivierung der Tumorzellen

Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Tumorzellen geerntet, um sie für Versuche zu verwenden oder zum Zweck der Subkultivierung zu splitten. Nach Absaugen der alten Nährlösung wurden sie gründlich mit PBS gespült, um so Serumspuren zu entfernen. Die Ablösung der adhären, teils aggregierten Zellen erfolgte unter Verwendung des proteolytischen Enzyms Trypsin. Hierfür wurde der Boden mit 10%iger Trypsin-Lösung überschichtet und für wenige Minuten bei 37 °C, dem physiologischen Optimum des Enzyms, inkubiert. Das Detachement der Zellen wurde mikroskopisch kontrolliert und schließlich durch die doppelte Menge an Medium gestoppt. Das mit Serum supplementierte Medium inhibiert dabei den Proteolyse-Prozess, da das enthaltene α -1-Antytrypsin Trypsin antagonisiert. Verbliebene Zellklumpen wurden durch Pipettieren vorsichtig vereinzelt, die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (1200 rpm, 21 °C, 3 min). Das gewonnene Pellet wurde mit frischem Kulturmedium resuspendiert und die Zellen anschließend ausgezählt: manuell unter Mikroskopie einer Zählkammer (*nach Neubauer*) oder automatisiert mittels Zellzählgerät (*Scepter Cell Counter*). Die gewünschte Zellzahl wurde wiederum ausgesät.

3.5.1.4. Subkultivierung der Immunzellen

Um die Immunzellen zu splitten, wurden sie pelletiert (1200 rpm, 21 °C, 4 min) und überstehendes Medium zu zwei Dritteln verworfen, der Rest aber belassen. Dieses konditionierte Medium wurde mit frischem Vollmedium versetzt und die Suspensionszellen in einem definierten Volumen schonend resuspendiert. Zur

Zellzählung wurde ein Aliquot angefärbt. Hierfür wurden 10 µl der zu zählenden Zellsuspension entnommen, mit einer Lösung des Vitalfarbstoffs Trypanblau im Verhältnis 1:2 verdünnt und alsdann zügig ausgezählt. Da der Farbstoff in perforierte und tote Zellen diffundiert, können diese mikroskopisch von morphologisch „vitalen Zellen“ abgegrenzt werden (*Trypanblau-Exklusionstest*). Die ausgezählten, vitalen Zellen wurden daraufhin auf eine definierte Dichte von $2,5 \times 10^6$ Zellen/10 ml ausgedünnt (Optimum für NK3.3). Anders als die NK-Zellen der Linie NK3.3 wurden die finiten CBMC nicht subkultiviert, sondern direkt für Versuche verwendet und danach verworfen.

3.5.1.5. Kryokonservierung von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen nach der Ernte pelletiert und in einem speziellen Medium resuspendiert. Diesem Einfrieremedium, RPMI versetzt mit 10 % FBS, werden 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) beigemischt, wodurch eine Eiskristallbildung während des Einfrierprozesses verhindert werden soll. Zum Einfrieren wurden 10^6 Zellen/ml Medium eingestellt und je 1 ml pro Tiefgefriereröhrchen portioniert. Die Kryoröhrchen wurden in einer speziellen Einfrierhilfe (*Einfriergerät Qualifreeze*) schonend über ca. 4 h kontinuierlich um 1 °C/min und über Nacht in einer -80 °C Gefriertruhe heruntergekühlt, ehe sie schließlich in flüssigen Stickstoff (-160 bis -196 °C) überführt wurden.

3.5.1.6. Rekultivierung von Zellen

Um einer Variabilität der Zellen – z. B. einer Veränderung des Expressionsprofils – vorzubeugen, verblieben sie nicht unbegrenzt in Kultur, sondern wurden nach ca. zehn Passagen (d. h. nach max. drei Monaten, NK3.3 nach max. zwei Monaten) verworfen. Bei Bedarf konnte die jeweilige Zelllinie aus dem tiefgefrorenen Zellpool erneuert werden. Dafür wurden die Ampullen im warmen Wasserbad angetaut. Die noch teilgefrorene Suspension wurde zügig in ein Röhrchen mit 15 ml vorgelegtem, gekühltem Kulturmedium überführt, worin sie sich schnell verflüssigte und direkt zentrifugiert. V. a. der zytotoxischen DMSO-Wirkung wegen wurde der Überstand sehr sorgfältig abgesaugt, ehe das Pellet mit frischem Medium resuspendiert und die Zellen in Kultur genommen wurden. Der erste Mediumwechsel erfolgte am Folgetag. Um weiterhin auf alle Zelllinien zurückgreifen zu können, musste der Stock eingefrorener Zellen gelegentlich wiederbefüllt werden. Hierfür wurden Zellen nach dem Auftauen auf eine ausreichende Zellzahl angezüchtet bevor sie nach nur kurzer Kultivierungszeit erneut eingefroren wurden.

3.5.2. Vorversuche in Monokultur

Während für Herceptin auf Vorarbeiten der AG zurückgegriffen werden konnte, galt es die optimalen Konzentrationen der zwei Zytostatika erst zu ermitteln. Die einzusetzenden Dosen wurden in einer Serie von Vorversuchsreihen an den Tumorzelllinien titriert und zuletzt für die NK-Zelllinie NK3.3 verifiziert. Mit dem Ziel, diejenige Dosis zu definieren, bei der die Tumorzellen zwar in ihrem Zellzyklus arretiert, aber noch nicht in Apoptose gehen, wurde *zum einen* die dosisabhängige S-Phase- und *zum anderen* die Apoptose-Fraktion und die Zellzahl ausgewertet.

3.5.2.1. Zellkultur für die Vorversuche an Monokulturen

An d 0 wurden die Tumorzellen bzw. die NK-Zellen der Linie NK3.3 in definierter Dichte in je 2 ml Kulturmedium/Well auf die Platten aufgebracht. Dabei variierte die Zelldichte für die verwendeten Zelllinien

in Abhängigkeit von ihrer individuellen Verdopplungszeit. Zu enge Zell-Zell-Verbindungen induzieren in den Tumorzellen zwar keinen kompletten Vermehrungsstopp wie in integren Zellen, hindern sie aber auch am Proliferieren, was kleinere S-Phase-Fractionen spiegeln (Vorarbeiten der AG). Da die Zytostatika-Sensitivität eines Gewebes aber von der Teilungsrate abhängt, sollten die Zellen zum Zeitpunkt ihrer Ernte die Wells nicht überwuchern, sondern noch zur Teilung in der Lage, d. h. sub-konfluent sein. Die Zellen wurden für 72 h (3 d) inkubiert, sodass die Aussaat adhären und proliferieren konnte, ehe an d 3 ein Mediumwechsel für die Monokulturen durchgeführt wurde und die 72-h-Werte stimuliert wurden. Analog wurde an d 4 für die 48-h-, an d 5 für die 24-h- und an d 6 für die 4-h-Werte verfahren. An d 6 erfolgte die Ernte aller Ansätze, die dann ausgezählt und hinsichtlich ihrer S-Phase- oder Apoptose-Fraktion analysiert wurden.

Targetzelllinien	Targetzellen/Well	Effektorzelllinie	Effektorzellen/Well
BT-474	0,12 x 10 ⁶	NK3.3	0,50 x 10 ⁶
JIMT-1	0,10 - 0,15 x 10 ⁶		

Tabelle 6: Für die Monokultur-Vorversuche eingesetzte Zelllinien und -zahlen.

3.5.2.2. Zellernte und -präparation für den DAPI-Assay

Um die Messung methodisch nur gering zu beeinflussen, wurde die Zellernte wie -präparation zügig und unter kontinuierlicher Kühlung der Zellen durchgeführt. Zur Zellernte wurden die überstehenden Medien verworfen, die Wells mit je 1,5 ml PBS gründlich gespült und mit je 0,5 ml Trypsinlösung trypsinisiert. Die Proteolyse wurde nach 3-5 min durch 1 ml Serum-substituiertes Medium unterbunden und die geerntete Suspension schließlich in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Je Röhrchen wurden weitere 2 ml Medium zugegeben, um die Suspension durch Invertieren zu „homogenisieren“ (ca. 20 x). Mittels Zellzähler (Scepter 2.0 Cell Counter) wurde die Zelldichte der einzelnen Suspensionen ermittelt und durch Verwerfen des überschüssigen Volumens für jedes Röhrchen auf 0,25 x 10⁶ Zellen eingestellt. Nach dem Tarieren der Zellzahlen wurde zentrifugiert, die Zellen in 2 ml PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 70%igem Methanol, das die Membran der Zelle als auch des Kerns permeabilisiert. Um Verklumpungen zu vermeiden wurden die Zellpellets unter Vibrieren des Vortexmischers zügig in je 500 µl der leicht flüchtigen, kurzkettigen Verbindung suspendiert und über Nacht bei 4 °C gekühlt inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde – nach zwei Waschgängen mit je 1 ml Waschpuffer – die DAPI-Färbung der DNA durchgeführt. Um durch die zuletzt zugegebenen 5 µl DAPI (21 °C, ≥ 30 min) tatsächlich nur die DNA zu färben, wurde die RNA zunächst durch 25 µl RNase A + 220 µl Waschpuffer (37 °C-Wasserbad, 20 min) denaturiert. Nach erneutem Vortexen wurde die Suspension schließlich bei einer Durchflussfrequenz von ca. 300 events/s am FACS vermessen.

Fluorochrom	Konjugat	Zielstruktur
DAPI	-	10 µl Desoxyribonukleinsäure

Tabelle 7: Färbung der Zellen für den DAPI-Assay.

3.5.2.3. Zellernte und -präparation für den Annexin V/FITC-Assay

Die Zellen wurden wie oben erörtert geerntet, nur wurden die überstehenden Medien und die Spüllösung nicht verworfen, sondern gesammelt, da darin die (prä-)apoptotischen Zellen, die hier interessierten,

schwimmen. Je 15-ml-Röhrchen wurden 5 ml PBS vorgelegt, die geerntete Zellsuspension hierin überführt und schließlich zentrifugiert. Aufgenommen in je 75 µl Annexin-Lösung wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Zuletzt wurden 200 µl Annexin-Bindungspuffer zugegeben und die Zellen resuspendiert. 1 min vor Messung der jeweiligen Probe am Durchflusszytometer, wurden 10 µl DAPI hinzu pipettiert und kurz gevortext.

Fluorochrom	Konjugat	Zielstruktur
FITC	Annexin 5 µl	Phosphatidylserin
DAPI	- 10 µl	Desoxyribonukleinsäure

Tabelle 8: Färbung der Zellen für den Annexin V/FITC-Assay.

3.5.3. Versuche in Kokultur

Um die (neo-)adjuvante Antikörper-basierte Therapie *in vitro* zu simulieren, wurden Target- und Effektorzellen kokultiviert und *in An- wie Abwesenheit des Anthracyclins/Taxans* analysiert. Dabei fand als Targetzelle v. a. die Herceptin-sensitive Her2⁺ Brustkrebszelllinie BT-474 Verwendung. Für weiterführende, vergleichende Versuche wurden aber auch resistente Brustkrebszellen verwendet. Als Effektorzellen fungierten NK-Zellen (NK3.3) bzw. MNC (CBMC). Deren Verhältnis, die *effector to target cell ratio (E:T Ratio)*, wurde z. T. variiert. Entweder wurde eine 1:1 und/oder eine 5:1 E:T Ratio gewählt:

Targetzelllinien	Targetzellen/ Well	Effektorzellen/ Well			
		NK3.3/Well		MNC/Well	
		1:1 E:T Ratio	5:1 E:T Ratio	1:1 E:T Ratio	5:1 E:T Ratio
BT-474	0,12 x 10 ⁶	0,2 x 10 ⁶	1 x 10 ⁶	-	0,6 x 10 ⁶
JIMT-1	0,10 x 10 ⁶	0,17 x 10 ⁶	-	-	-
MDA-MB-453	0,12 x 10 ⁶	0,25 x 10 ⁶	-	-	-

Tabelle 9: Für die 1:1 und 5:1 Kokultur-Versuche eingesetzte Zelllinien und -zahlen.

Die Vorarbeiten der AG und die Vorversuche legten letztlich folgende Konzentrationen der drei Therapeutika nahe, die für die eigentlichen (Kokultur-)Versuche entsprechend festgesetzt wurden:

- **Trastuzumab: 2 µg/ml**
- **Epirubicin: 0,02 µg/ml**
- **Paclitaxel: 0,005 µg/ml**

Da das experimentelle Setting sowohl Mono- als auch kombinierte Therapieregime reproduzieren sollte, wurden jeweils folgende Bedingungen getestet:

- **Tumorzellen ± Anthracyclin/Taxan**
- **Effektorzellen ± Anthracyclin/Taxan**
- **Tumorzellen + Trastuzumab ± Anthracyclin/Taxan**
- **Tumorzellen + Effektorzellen ± Anthracyclin/Taxan**
- **Tumorzellen + Effektorzellen + Trastuzumab ± Anthracyclin/Taxan**

3.5.4. Versuche mit NK3.3 als Effektorzellen

3.5.4.1. Zellkultur und -präparation für den Annexin V/FITC-Assay

Die Tumorzellen wurden an d 1 in je 2 ml Kulturmedium/Well auf 6-Well-Platten aufgebracht, wobei die Dichte der Aussaat von der Proliferationsrate der Zelllinie abhängig war (0-h-Zeitpunkt). Pro Versuchsreihe wurde nur mit jeweils einer der drei Linien gearbeitet. Die vorgesehenen Monokultur- wie Kokultur-Wells wurden mit den Tumorzellen belegt und für 72 h (3 d) inkubiert, sodass die Aussaat adhäreren und proliferieren konnte, ehe die Kokultivierung erfolgte bzw. für die Monokulturen ein Mediumwechsel durchgeführt wurde (72-h-Zeitpunkt).

Um die Kokulturen anzusetzen, wurden die alten Medien abgenommen und die NK3.3-Zellen – suspendiert in je 2 ml NK-Zell-Medium – in die entsprechenden Wells gegeben. Es wurde zügig pipettiert, damit die Tumorzellen nicht zu lange trocken lagen. Die Ratio von Effektor- zu Tumorzellen wurde für die verschiedenen Versuchsreihen variiert: 1:1 und 5:1 effector to target cell ratio (E:T). Die erforderliche NK-Zellzahl wurde dabei um den zeitlichen Vorlauf der Tumorzellen (72 h in Monokultur) korrigiert. Zeitgleich zu den Kokulturen wurden auch die reinen NK3.3-Kontrollkulturen in je 2 ml NK-Zell-Medium/Well angesetzt. Bei den bereits angesetzten reinen Tumorzell-Kontrollkulturen erfolgte, vor dem Hintergrund gleicher Kulturbedingungen, ein Medienwechsel mit 2 ml NK-Zell-Medium/Well. Direkt danach wurde ggf. behandelt (72-h-Zeitpunkt). Die Belegung wie Behandlung der Wells kann der folgenden Tabelle entnommen werden:

Ansatz	Tumorzellen	Effektorzellen	Behandlung		
1	TZ	-	-	-	-
2	-	NK3.3	-	-	-
3	TZ	NK3.3	-	-	-
4	TZ	-	Trastuzumab	-	-
5	TZ	NK3.3	Trastuzumab	-	-
6	TZ	-	-	Epirubicin	-
7	-	NK3.3	-	Epirubicin	-
8	TZ	NK3.3	-	Epirubicin	-
9	TZ	-	Trastuzumab	Epirubicin	-
10	TZ	NK3.3	Trastuzumab	Epirubicin	-
11	TZ	-	-	-	Paclitaxel
12	-	NK3.3	-	-	Paclitaxel
13	TZ	NK3.3	-	-	Paclitaxel
14	TZ	-	Trastuzumab	-	Paclitaxel
15	TZ	NK3.3	Trastuzumab	-	Paclitaxel

Tabelle 10: Ansätze für den Annexin V/FITC-Assay.

Die 1:1 Ansätze ± Behandlung wurden für 24 h, 48 h und 72 h (d. h. 3 x 15 Ansätze pro Versuch), die 5:1 Ansätze für 4 h und 24 h (d. h. 2 x 15 Ansätze pro Versuch) inkubiert, ehe deren Ernte erfolgte. Die geerntete Zellsuspension wurde schließlich zentrifugiert, 1 x mit FACS-Puffer (1,5 ml) gewaschen und erneut zentrifugiert (1200 rpm, 4 min, 4 °C). Um unspezifische Antigenbindungsstellen abzusättigen, wurden diese Pellets in 20 µl 1%igem murinem Serum resuspendiert und für 20 min im Dunklen unter Kühlung der Zentrifugenröhrchen vorinkubiert (4 °C). Auf den Fc-Rezeptor-Block folgten die beiden Färbungen. Für die erste Färbung wurden Fluoreszenz-konjugierte Antikörper verwendet, die der Detektion und Differenzierung

der Effektor- und Tumorzellen dienten. Über Her2/neu – spezifische Struktur der eingesetzten Brustkrebszelllinien – wurden die Tumorzellen, über NKp46 die NK-Zellen identifiziert. Je Färbeansatz wurden 8 µl Anti-Her2/PE AK, 3 µl Anti-NKp46/APC AK und 15 µl FACS-Puffer pipettiert, resuspendiert und wiederum für 30 min im Dunklen unter Kühlung inkubiert (4 °C):

Fluorochrom	Antikörper	Antigen
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl	NKp46
PE	anti-human Her2/neu, IgG1, κ 8 µl	Her2/neu

Tabelle 11: Färbung der Zellen zur Diskriminierung der Her2⁺ Tumorzellen und der NKp46⁺ NK-Zellen.

Nach einmaligem Waschen mit Annexin-Bindungspuffer (1,8 ml) wurde die Zellsuspension zentrifugiert und nach sauberem Absaugen in 5 µl Annexin V/FITC und 70 µl Annexin-Bindungspuffer je Ansatz aufgenommen. Die Zellen wurden für die Färbung erneut 20 min gekühlt und im Dunkeln inkubiert, ehe sie mit 100 µl Annexin-Bindungspuffer verdünnt wurden. Jeweils 1 min vor Messung wurde 10 µl DAPI hinzugegeben:

Fluorochrom		Zielstruktur
FITC	Annexin 5 µl	Phosphatidylserin
DAPI	10 µl	Desoxyribonukleinsäure

Tabelle 12: Färbung der Zellen für den Annexin V/FITC-Assay.

3.5.4.2. Zellkultur und -präparation für die NK-Phänotypisierung

Die Versuche wurden, um sie in Bezug setzen zu können, wie die vorbeschriebenen NK-Zell-Experimente konzipiert, lediglich die (i. R. der Phänotypisierung irrelevanten) reinen Tumorzellkulturen entfielen. Es wurden Herceptin-sensitive Zellen der Linie BT-474 (= Targetzellen) verwendet und 1:1 mit den NK3.3-Zellen (= Effektorzellen) kultiviert. Die Ansätze können der Tabelle entnommen werden:

Ansatz	Tumorzellen	Effektorzellen	Behandlung		
1	-	NK3.3	-	-	-
2	BT-474	NK3.3	-	-	-
3	BT-474	NK3.3	Trastuzumab	-	-
4	-	NK3.3	-	Epirubicin	-
5	BT-474	NK3.3	-	Epirubicin	-
6	BT-474	NK3.3	Trastuzumab	Epirubicin	-
7	-	NK3.3	-	-	Paclitaxel
8	BT-474	NK3.3	-	-	Paclitaxel
9	BT-474	NK3.3	Trastuzumab	-	Paclitaxel

Tabelle 13: Ansätze für die NK-Phänotypisierung.

Die Ernte erfolgte nach 24 h, 48 h und 72 h (d. h. 3 x 9 Ansätze pro Versuch) entsprechend dem obigen Protokoll, wobei die verwendeten Medien, um die Suspensionszellen nicht zu verlieren, nicht verworfen werden durften. Die geernteten Zellsuspensionen wurden zentrifugiert (1200 rpm, 4 min, 21 °C), die Pellets in 2,2 ml Puffer resuspendiert und die Resuspension à je 1 ml auf zwei Zentrifugenröhrchen aufgeteilt: eines für die Färbung, das andere für die Isotyp-Kontrolle. Zuvor wurden die Zellen neuerlich zentrifugiert und über 20 min mit 20 µl des 1%igen murinen Serums blockiert, ehe sie über 30 min wie folgt kühl im Dunklen konjugiert wurden:

Fluorochrom	Färbung	Isotyp
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl
V450	anti-human CD56, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 1,5 µl
PE	anti-human CD16, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 0,5 µl
PE/Cy7	anti-human CD27, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 0,75 µl
FITC	anti-human CD137, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 0,018 µl

Tabelle 14: Färbung der Zellen für die NK-Phänotypisierung.

Nach Inkubation wurden alle Ansätze mit FACS-Puffer gewaschen (1,5 ml) und für die durchflusszytometrische Messung in 150 µl dieses Puffers aufgenommen.

3.5.4.3. Zellkultur und -präparation für die intrazelluläre Zytokinfärbung

Die Durchführung erfolgte in Anlehnung an das Kit Manual *BD Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (with BD GolgiStop protein transport inhibitor containing monensin)*:

Auch hier konnte auf die reinen Tumorzell-Kontrollkulturen verzichtet werden. 10⁶ BT-474- Zellen wurden auf 6-Well-Platten in je 1 ml Kulturmedium/Well ausgesät. Sie wurden über Nacht inkubiert, sodass sie vor Kokultivierung adhären konnten. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium entfernt und die Mono- wie Kokulturen mit 10⁶ Mio. NK-Zellen in je 1 ml NK-Zell-Medium/Well angesetzt. Daraufhin wurden die Ansätze entsprechend den in der Tabelle aufgeführten Konzentrationen und Kombinationen behandelt.

Ansatz	Tumorzellen	Effektorzellen	Behandlung		
1	-	NK3.3	-	-	-
2	BT-474	NK3.3	-	-	-
3	BT-474	NK3.3	Trastuzumab	-	-
4	BT-474	NK3.3	Trastuzumab	Epirubicin	-

Tabelle 15: Ansätze für die intrazelluläre Zytokinfärbung.

Nach 1 h Inkubation erfolgte der Golgi-Block, wofür 10 µl von (1:15,15 verdünntem) *BD GolgiStop* (Monensin-Lösung) je Well pipettiert und für 5 h bis zur Zellernte stimuliert wurde (Verteilung durch leichtes Schwenken).

Ziel der Zellernte war es, alle NK-Zellen zu gewinnen, aber nur wenige der Targetzellen vom Boden zu lösen, weshalb auf Trypsin als aggressiv andauendes Enzym verzichtet wurde. Vor dem Ernten der Zellen wurden die Wells zuerst leicht geschwenkt, um abgesunkene NK-Zellen aufzuwirbeln und die Überstände unmittelbar in die einzelnen Zentrifugenröhrchen überführt. Die NK-Zellen setzen sich aber nicht nur ab, sondern binden über ihren Fcγ-Rezeptor an die Fc-Region von Immunglobulin G, d. h. an Targetzell-gebundenes Trastuzumab. Um diese Zell-Zell-Interaktion zu dissoziieren, wurden die Zellen für wenige Minuten (5 min) mit 1 ml PBS/2 mM EDTA inkubiert. Nach Abpipettieren der PBS/EDTA-Überstände in die jeweiligen Zentrifugenröhrchen wurden die Proben erneut zentrifugiert. Die gewonnenen Pellets wurden schließlich mit 2,15 ml Pufferlösung resuspendiert, jeweils in Färbe- (≈ 1 ml) und Kontroll-Ansatz (≈ 1 ml) à ca. 0,5 x 10⁶ Zellen aufgeteilt und erneut zentrifugiert. Das Blockieren unspezifischer Proteinbindungsstellen erfolgte unter Verwendung von 20 µl 1 % Mausserum je Tube (20 min bei 4 °C im Dunklen). Darauf folgte die **extrazelluläre Färbung** mit 3 µl Anti-NKp46/APC AK (30 min bei 4 °C im Dunklen):

Fluorochrom	Färbung	Isotyp
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl

Tabelle 16: Extrazelluläre Färbung der Zellen.

Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 100 µl 4 % Paraformaldehyd fixiert (15 min bei 4 °C im Dunkeln) und nach zwei weiteren Waschschrritten mit 50 µl *BD Brilliant Stain Buffer* resuspendiert und über Nacht inkubiert (bei 4 °C im Dunkeln). Am Folgetag wurden die Zellen nach Zentrifugation durch *BD Perm/Wash Buffer* permeabilisiert. Der Permeabilisierungspuffer wurde hierfür 1:10 mit gefiltertem H₂O verdünnt, wobei die Zellen schließlich mit jeweils 500 µl der verdünnten Lösung inkubiert wurden (15 min bei 4 °C im Dunkeln). Nach abermaliger Zentrifugation folgte letztlich die **intrazelluläre Färbung** des in 37,5 µl *BD Perm/Wash Buffer* resuspendierten Pellets (30 min bei 4 °C im Dunkeln). Vor der Messung am Flow Cytometer wurden die Zellen wiederum mit FACS-Puffer gewaschen und 100 µl FACS-Puffer zugegeben.

Fluorochrom	Färbung	Isotyp
BV421	anti-human IFN-γ, IgG1, κ 2,5 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 2,5 µl
FITC	anti-human Perforin, IgG2b, κ 10 µl	mouse IgG2b, κ Isotype Control 10 µl

Tabelle 17: Intrazelluläre Färbung der Zellen.

3.5.5. Versuche mit MNC als Effektorzellen

3.5.5.1. Isolierung der MNC

Während auf die NK-Zellen der Linie NK3.3 direkt zurückgegriffen werden konnte (Stock), mussten die *cord blood(-derived) mononuclear cells CBMC* erst aus *cord blood* isoliert werden. Die CBMC wurden dabei durch Aufreinigung und Aufarbeitung des Plazentarestblutes von sechs Entbindenden, die schriftlich in die Spende eingewilligt hatten, gewonnen. Dafür wurde unmittelbar nach Abnabelung der Neugeborenen die Nabelschnur bzw. die darin verlaufende unpaare Nabelvene (Vena umbilicalis) punktiert und das Nabelschnurblut steril in ein beschichtetes Beutelsystem drainiert. Durchgeführt wurde die Punktion durch ärztliche Kolleg*innen der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe am Caritas-Krankenhauses St. Josef, Regensburg, die diese geschützt (thermo- wie lichtisoliert) via Kurierdienst versandten.

Dichtegradientenzentrifugation

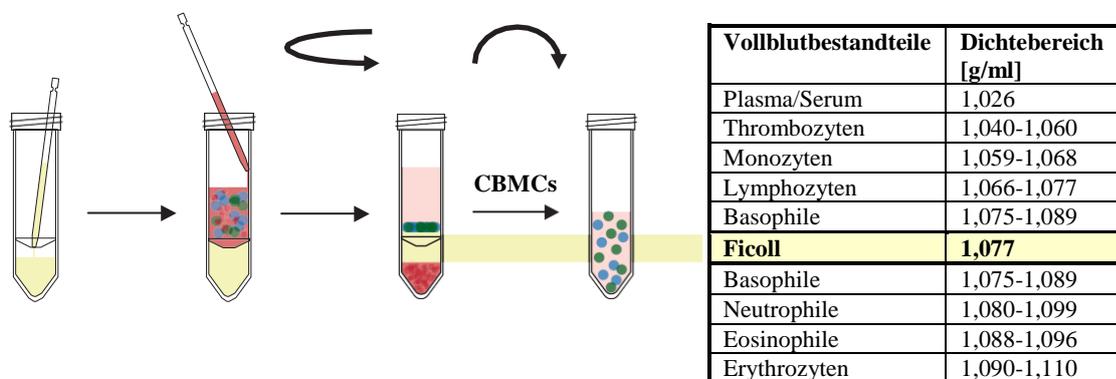


Abbildung 14: Dichtegradientenzentrifugation und Dichtebereiche verschiedener Vollblutzellen/-komponenten. [modifiziert nach STEMCELL Technologies¹⁴⁰ und nach Luttmann et al¹⁴¹] Unter Verwendung einer Trennlösung (Ficoll) gelingt die Separation der Blutbestandteile. Zellen geringer Dichte wie MNCs reichern sich dabei i. R. der Zentrifugation an der Phasengrenze zw. Plasma und Trennlösung an.

Die für die Versuche verwendeten CBMC/MNC, die u. a. auch periphere polyklonale NK-Zellen enthalten, wurden durch Dichtegradientenzentrifugation der Blutproben gewonnen (vgl. Abb. 14).

Dafür wurden die Reagenzien, PBS und Pancoll, zunächst auf Raumtemperatur angewärmt. Die Vollblut-Konserve wurde durch vorsichtiges Schwenken durchmischt, ehe jeweils 25 ml Blut in ein 50-ml-Röhrchen überführt und mit weiteren 25 ml vortemperiertem PBS durch Invertieren der verschlossenen Röhrchen verdünnt wurden (1:2). Weiterhin wurden je 15 ml Pancoll in mehrere 50-ml-Röhrchen vorgelegt und sehr vorsichtig mit dem doppelten Volumen der verdünnten Blutprobe überschichtet, sodass sich die Schichten nicht vermischten. Nach akkuratem Austarieren folgte die Dichtegradientenzentrifugation der Falcons, wobei nur gering beschleunigt und nicht gebremst werden durfte (30 min, 21 °C, 600g ohne Bremse). Pancoll diente dabei als physikalische Trennlösung. Das enthaltene Ficoll, ein synthetisches Copolymer definierter Dichte (1,077 g/ml), erlaubte die Auftrennung der einzelnen Blutzellreihen. Entsprechend ihrer Schwebedichte migrierten Zellen höherer Dichte durch die Trennlösung und sedimentierten, wogegen Zellen geringerer Dichte – insbesondere Lymphozyten und Monozyten – an der Phasengrenze zwischen Plasma und Pancoll flottierten und einen milchig-trüben Film bildeten. Nach Abnehmen der klaren Plasmaphase, die dem trüben Lymphozytenfilm aufschwamm, wurde dieser vorsichtig in 50-ml-Röhrchen mit bereits vorgelegten 25 ml PBS/2 mM EDTA pipettiert, ohne dabei die Pancoll-Phase zu durchstoßen. Die Röhrchen wurden erneut – nun jedoch mit Bremse – zentrifugiert, insbesondere um noch verbliebene Thrombozyten zu eluieren (10 min, 4 °C, 300g mit Bremse). Die gewonnenen Pellets wurden schließlich mit je 5 ml PBS/2mM EDTA resuspendiert und in Vorbereitung der folgenden Schritte die Zelldichte ermittelt. Hierfür wurden 10 µl der Zellsuspension 1:10 mit Türk'scher Lösung verdünnt. Türk'sche Lösung enthält zum einen Ethansäure, die die verbliebene Erythrozyten lysiert, zum anderen Gentianaviolett das Leukozytenkerne zart-violett anfärbt und deren Zellzählung derart erleichtert.

Magnetische Zellseparation

Neben differenzierten Zellen der weißen Blutzellreihe finden sich in der isolierten Suspension in geringer Frequenz ferner sog. hämatopoetische Stammzellen (HS). Letztere unterscheiden sich von bereits differenzierten Zellen wesentlich durch ihre Selbsterneuerungs- und Differenzierungspotenz: HS sind noch nicht hinsichtlich eines Zelltyps determiniert, sondern können zeitlebens zu jeder Blutzelle differenzieren. Anhand eines charakteristischen CD-Antigens, CD34, das differenzierte Zellen, die linien-spezifische CD-Moleküle exprimieren, verlieren, können HS bzw. Progenitorzellen identifiziert und isoliert werden.

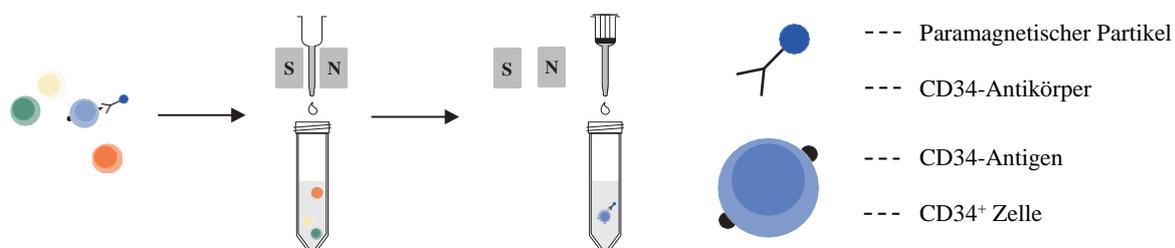


Abbildung 15: Magnetic Cell Separation MACS. [modifiziert nach Miltenyi Biotec¹⁴²] Im ersten Schritt werden die interessierenden Zellen (hier: CD34⁺ Zellen) mit paramagnetischen Partikeln markiert, an die ein Antikörper gekoppelt ist, der gegen ein die zu isolierende Zelle definierendes Antigen gerichtet ist (hier: CD34-Antigen bzw. Anti-CD34-Antikörper). Die MicroBead-markierten Zellen können dann magnetisch über eine Säule aus Stahlmatrix separiert werden, da die Antigen-exprimierenden Zellen darin zurückgehalten werden.

Als ein Standardverfahren der Stammzellanreicherung, das sich diese spezifische Expression zunutze macht, hat sich die von Miltenyi Biotec entwickelte *Magnetic Cell Separation MACS* durchgesetzt (vgl. Abb. 15). Die Separation erfolgt in Anlehnung an deren *CD34 MicroBead Kit*-Protokoll.

Um die Stammzellen magnetisch zu separieren, müssen sie MicroBead-markiert werden. MicroBeads sind 50 nm durchmessende paramagnetische Partikel, die mit Immunglobulinen beschichtet sind. Diese gekoppelten Immunglobuline erkennen korrespondierende Epitope der Zielzellen und binden diese spezifisch. Zur CD34-Anreicherung bedarf es entsprechend Anti-CD34-AK-Beads. Die isolierten CBMC wurden mit 50 µl dieser Beads/10⁸ Zellen über 30 min inkubiert. Um einer unspezifischen Bindung vorzubeugen, wurde der Zellsuspension zudem zuvor/zeitgleich 50 µl Fc-Rezeptor-Block/10⁸ Zellen zugesetzt, der nicht-spezifische Antigenstellen absättigen sollte. Die bei 4 °C inkubierten Zellen wurden alle 10 Minuten leicht aufgerüttelt. Nach magnetischer MicroBead-Markierung musste einmalig mit 7 ml MACS-Puffer/10⁸ Zellen gewaschen werden, insbesondere um ungebundene Beads zu eluieren. Das gewonnene Pellet wurde vorsichtig in 500 µl Pufferlösung je 10⁸ Zellen aufgenommen, ohne die Zellsuspension aufzuschäumen.

Für das eigentliche Auftrennungsverfahren wurde eine Säule senkrecht in die Halterung des Separators eingespannt. Unmittelbar unterhalb wurde ein von Eis gekühltes 15-ml-Zentrifugenröhrchen als Auffanggefäß positioniert. Die Säule ist in ihrem Inneren aus einer Stahlmatrix aufgebaut und wird von einem Vorfilter definierter Porengröße (30 µm) bedeckt, der Zelldebris und -aggregate abfangen und so eine Verstopfung im Inneren verhindern soll. Der Separator selbst ist ein Permanentmagnet, dessen Feld die Säule aus Stahlkügelchen umgibt. Während der Aufreinigung sollte streng darauf geachtet werden, dass die Säule nicht austrocknet, da dadurch die Vitalität der Zielzellen gefährdet wäre. Weiterhin müssen Zellen wie Medien durchgehend gekühlt und alle Arbeitsschritte unter Kühlung durchgeführt werden. Vor Filtration wurde die Säule mit 500 µl gekühlter Pufferlösung vorgespült. Auf den Spülschritt folgte die Filtration der gelabelten Zellen. Die Zellsuspension wurde hierfür portioniert über den Filter in die Säule eingebracht. Nach Filtration wurde mit 500 µl gekühlter Pufferlösung nachgespült. Der Durchfluss wurde unter Verwendung eines neuen Vorfilters abermals auf die Säule aufgetragen, um derart den Ertrag zu erhöhen. Daraufhin wurde vierfach mit je 500 µl gekühltem Puffer gespült. Während CD34⁻ Zellen die Säule weitgehend ungehindert durchfließen, werden die MicroBead-markierten CD34⁺ Zellen magnetisch an der Stahlmatrix der Säule gehalten. Der aufgefangene Durchlauf enthielt folglich die Negativfraktion, d. h. CD34⁻ CBMC, die für die im Folgenden beschriebenen Versuche verwendet wurden.

Um die MicroBead-markierten Zellen zu gewinnen, wurde die Säule aus dem Magnetstand ausgebaut, über ein weiteres 15-ml-Zentrifugenröhrchen gesetzt und die positiven Zellen mit einem Spritzenstempel unter Spülung mit 1 ml Puffer zügig eluiert. Eine zweite Säule wurde im Separator installiert und die eluierte Zellsuspension erneut filtriert, um die Reinheit zu steigern. Hierfür wurde wiederum mit 500 µl gekühlter Pufferlösung vorgespült. Danach wurde das CD34⁺ Eluat aufgetragen, der Durchlauf aufgefangen und abermals aufgeladen. Nach dem Nachspülen (4 x mit je 500 µl gekühlter Pufferlösung) wurde die Säule aus dem Separator ausgebaut. Die MicroBead-gekoppelten Zellen wurden wie bereits besprochen mit 1 ml Puffer

gelöst in einem Gefäß gesammelt. Diese durch Positivselektion isolierten CD34⁺ HS wurden in andere Versuche der AG (im Setting des [Humanisierten Tumormaus] HTM-Modells) eingeschleust.

3.5.5.2. Zellernte und -präparation für den Annexin V/FITC-Assay

Die CD34⁻ CBMC-Fraktion, die durch Abreicherung gewonnen worden war, wurde indes für die Kokultivierungsversuche in Kultur genommen. Einen Tag nach der Aufreinigung fand die Aussaat der Targetzellen statt (0-h-Zeitpunkt): je $0,12 \times 10^6$ BT-474 in 2 ml Kulturmedium/Well. Um die MNCs, die sich unter den künstlichen Bedingungen der in-vitro-Kultur schnell erschöpfen, zügig für die Versuchsreihen zu verwenden, wurden die Tumorzellen kürzer als bei den NK3.3-Kokulturen vorinkubiert, sodass die Kokultivierung schon nach 24 h statt nach 72 h startete (24-h-Zeitpunkt). Die MNCs, respektive 10 µl der Suspensionskultur, wurden mit Türk'scher Lösung mikroskopiert und eine Zelldichte von $0,6 \times 10^6$ Zellen je 2 ml NK-Zell-Medium/Well, ergo eine 5:1 effector:target ratio, eingestellt. Die überstehenden Tumorzell-Medien wurden verworfen, die MNCs in die einzelnen Wells pipettiert und hiernach wie folgt behandelt:

Ansatz	Tumorzellen	Effektorzellen	Behandlung		
1	BT-474	MNC	-	-	-
2	BT-474	MNC	-	Epirubicin	-
3	BT-474	MNC	-	-	Paclitaxel
4	BT-474	MNC	Trastuzumab	-	-
5	BT-474	MNC	Trastuzumab	Epirubicin	-
6	BT-474	MNC	Trastuzumab	-	Paclitaxel

Tabelle 18: Ansätze für den Annexin V/FITC-Assay.

Die Analyse der Ansätze fand nach 24 h und 48 h statt (d. h. 2 x 6 Ansätze pro Versuch), wobei die Zellen wie gewohnt geerntet und präpariert wurden. Abweichend vom obigen Protokoll wurden lediglich zwei Zwischenschritte eingefügt: Zum einen wurden die Zellen, um verbliebene Erythrozyten zu destruieren, über 5 min mit *BD Lysing Buffer* inkubiert – und zwar nach der ersten (Anti-Her2/PE AK, Anti-NKp46/APC AK), aber vor der zweiten Färbung (Annexin/FITC, DAPI). Zum anderen wurden sie direkt vor der durchflusszytometrischen Messung durch ein Nylonnetz gefiltert, da die primären Hämocyten zu konglutinieren neigen.

Fluorochrom	Antikörper		Antigen
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ	3 µl	NKp46
PE	anti-human Her2/neu, IgG1, κ	8 µl	Her2/neu

Tabelle 19: Färbung der Zellen zur Diskriminierung der Her2⁺ Tumorzellen und der NKp46⁺ NK-Zellen.

Fluorochrom		Zielstruktur
FITC	Annexin	Phosphatidylserin
DAPI		Desoxyribonukleinsäure

Tabelle 20: Färbung der Zellen für den Annexin V/FITC-Assay.

3.5.5.3. Zellernte und -präparation für die MNC-Phänotypisierung

Zeitgleich zur Kokultivierung wurden 2×10^6 MNCs phänotypisiert. Die entnommenen MNCs wurden hierfür zu je $0,5 \times 10^6$ in 15-ml-Röhrchen portioniert und 2 x mit je 1,5 ml Puffer gereinigt, ehe sie für 20 min mit je 20 µl murinem Serum gekühlt im Dunklen inkubiert wurden, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Um die Subsets der MNCs zu diskriminieren, wurde die differentielle Expression vierer Linien-spezifischer CD-Moleküle untersucht: CD3, CD19, CD33 und CD335 (NKp46). Vorrangig diente dies der Quantifizierung der NK-Zellen, die über NKp46 (Anti-NKp46/APC AK) detektiert werden können:

Fluorochrom	Färbung	Isotyp
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 2 µl
FITC	anti-human CD3, IgG1, κ 5 µl	anti-human CD3, IgG1, κ 5 µl
PE	anti-human CD19, IgG1, κ 5 µl	anti-human CD19, IgG1, κ 5 µl
PerCP	anti-human CD33, IgG1, κ 2 µl	anti-human CD33, IgG1, κ 2 µl

Tabelle 21: Färbung für die MNC-Phänotypisierung: 0,5 x 10⁶ MNCs für den Färbe-Ansatz, 0,5 x 10⁶ für den Kontroll-Ansatz.

Die über NKp46 identifizierten NK-Zellen wurden näher phänotypisiert. Das Phänotypisierungspanel zielte auf die Analyse der CD-Expression von CD56, CD16, CD27 und CD137 ab:

Fluorochrom	Färbung	Isotyp
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl
V450	anti-human CD56, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 1,5 µl
PE	anti-human CD16, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 0,5 µl
PE/Cy7	anti-human CD27, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 0,75 µl
FITC	anti-human CD137, IgG1, κ 3 µl	mouse IgG1, κ Isotype Control 0,018 µl

Tabelle 22: Färbung für die NK-Phänotypisierung: 0,5 x 10⁶ MNCs für den Färbe-Ansatz, 0,5 x 10⁶ für den Kontroll-Ansatz.

3.5.6. Differentielle Proteinexpressionsanalyse

Die 1:1 Kokulturen (BT-474 + NK3.3) ± Behandlung zur Proteinextraktion waren analog der anderen NK-Zell-Experimente konzipiert worden, konzentrierten sich aber auf die folgenden Bedingungen:

Ansatz	Anzahl	Tumorzellen	Effektorzellen	Behandlung
1	12 x	BT-474	NK3.3	-
2	12 x	BT-474	NK3.3	Trastuzumab
2	24 x	BT-474	NK3.3	Trastuzumab Epirubicin

Tabelle 23: Ansätze für die Proteinexpressionsanalyse.

3.5.6.1. Zellkultur und -präparation

Die Zellkultur und -ernte erfolgte wie gewohnt, jedoch wurde mit dem Ziel, die Zellen (noch) schonender loszulösen, nicht trypsiniert, sondern stattdessen mit 1 ml PBS/2 mM EDTA detachiert (5 min, 37 °C). Gleiche Bedingungen wurden gepoolt und die drei geernteten 50-ml-Tubes zentrifugiert.

3.5.6.2. MACS

Die Pellets wurden in 20 ml Medium resuspendiert, ausgezählt, abzentrifugiert und mit 2 ml Separationspuffer gewaschen. Suspendiert in 150 µl des Separationspuffers wurde den Zellen daraufhin zuerst 50 µl Fc-Rezeptor-Block zugegeben ehe sie für 30 min mit 50 µl der gegen ErbB2 gerichteten Beads inkubiert wurden (4 °C), um sie magnetisch zu markieren. Nach dem Labeling wurden die NK-Zellen wie in Kapitel 3.5.5.1. erläutert über eine Säule negativ separiert (angelehnt an das *Anti-ErbB-2 MicroBead*-Manual von Miltenyi Biotec). Nach der magnetischen Separation wurde die (ErbB2⁻) Negativ- und die (ErbB2⁺) Positivfraktion ausgezählt.

3.5.6.3. FACS

Um die Reinheit der aufgereinigten Proben zu überprüfen, wurden an drei Punkten der Prozedur jeweils $0,1 \times 10^6$ Zellen der drei Bedingungen entnommen und durchflusszytometrisch untersucht: und zwar direkt aus der geernteten Zellfraktion, aus der (ErbB2⁻) Negativ- und aus der (ErbB2⁺) Positivfraktion. Diese neun Suspensionen à $0,1 \times 10^6$ Zellen wurden zentrifugiert (1 x mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen), zum Zweck des Fc-Rezeptor-Blocks für 5 min in 20 µl 1%igem murinem Serum vorinkubiert, ehe jede Bedingung für 30 min in 15 µl FACS-Puffer, 3 µl Anti-NKp46/APC AK und 8 µl Anti-Her2/PE AK inkubiert wurde (4 °C, im Dunklen). Abermals mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und in 200 µl FACS-Puffer aufgenommen erfolgte die FACS-Analyse.

Fluorochrom	Antikörper	Antigen
APC	anti-human NKp46, IgG1, κ 3 µl	NKp46
PE	anti-human Her2/neu, IgG1, κ 8 µl	Her2/neu

Tabelle 24: Färbung der Zellen zur Diskriminierung der Her2⁺ Tumorzellen und der NKp46⁺ NK-Zellen.

3.5.6.4. Proteinernte

In Vorbereitung der „Proteinernte“ wurden die drei Röhrchen mit dem „Flow Through“ der jeweiligen Bedingung zentrifugiert und resuspendiert in 1 ml PBS in beschriftete Eppendorf-Cups pipettiert. Diese wurden wiederum zentrifugiert und die Pellets mit 5 µl Protease-Inhibitor (*Complete Protease Inhibitor Cocktail*) resuspendiert, ehe sie bei -20 bis -80 °C eingefroren wurden.

3.5.6.5. Proteinextraktion und Antibody-Array (durch Sciomics, Neckargemünd)

Die gefrorenen Zellen wurden zu *Sciomics (Scientific Protein Profiling Service)* gesendet, die die eigentliche Proteinextraktion und -präparation für den Antibody-Array durchführten und diesen auch auswerteten. Die Proteinprofilierung ermöglichte der ImmunoTools multiplex Award.

4. Ergebnisse

4.1. Vorversuche zur Definition der Anthracyclin-/Taxan-Konzentration

Während im Hinblick auf die Herceptin-Konzentration (2 µg/ml) auf Vorarbeiten der AG zurückgegriffen werden konnte, mussten die geeigneten Dosen des Anthracyclins (Epirubicin) und des Taxans (Paclitaxel) erst ermittelt werden. Die einzusetzenden Dosen wurden in einer Serie von Vorversuchsreihen an drei Her2⁺ Tumorzelllinien titriert und zuletzt für die NK-Zelllinie NK3.3 verifiziert. Mit dem Ziel, diejenige Dosis zu definieren, bei der die Zellen zwar noch nicht (relevant) untergehen, aber bereits in ihrem Zellzyklus kompromittiert werden, wurde neben der konzentrationsabhängigen Zellzahl, jeweils in % der unbehandelten Kontrolle, *einerseits* die Apoptose-Fraktion, *andererseits* die S + G₂-Phase-Fraktion zu vier Zeitpunkten (4 h, 24 h, 48 h und 72 h) ausgewertet.

Die eingesetzten Anfangsdosen, die sich an anderen Arbeiten ausgerichtet hatten – 0,5 µg/ml für Epirubicin und 10 µg/ml für Paclitaxel – stellten sich unter diesem Gesichtspunkt als (viel) zu hoch heraus. Aufnahmen der ersten Paclitaxel-Titrationsreihe (1,0-10 µg/ml) veranschaulichen das: Zu sehen sind nicht-behandelte vs. behandelte Zellen der Linie SK-BR-3, einer Her2⁺ Herceptin-sensiblen, i. R. dieses Projektes jedoch nicht weiterverwendeten Zelllinie. Die nicht-behandelten, polygonalen Zellen bilden lockere Zellverbände, in den drei Paclitaxel-behandelten Kulturen können bei den initialen (hohen) Konzentrationen dagegen kaum noch vitale Zellen abgegrenzt werden (vgl. Abb. 16, überwiegend kleine, kugelige avitale Zellen bzw. Zellreste). Die abgebildete Epirubicin-Reihe (0,05-0,05 µg/ml) fängt dagegen gerade den Übergang ein: Während die Zellen initial noch vorrangig am Proliferieren gehindert werden, gehen bei den steigenden Dosen wiederum zunehmend Zellen zugrunde (vgl. Abb. 17).

Nach einer ersten Eingrenzung wurden zur Definition der „optimalen“ Konzentrationen alle drei oben genannten Readout-Parameter (Zellzahl, Apoptose- und S + G₂-Phase-Fraktion) herangezogen. Die konzentrationsabhängigen Effekte von Epirubicin bzw. Paclitaxel auf BT-474 bzw. NK3.3 können in den Abbildungen 18 bzw. 19 nachvollzogen werden: Epirubicin bremste die Targetzelllinie BT-474 ab Konzentrationen von 0,02-0,04 µg/ml in ihrem Zellzyklus aus, Paclitaxel bereits ab Konzentrationen von 0,002-0,005 µg/ml. Hier stieg die S + G₂-Phase-Fraktion (nach 48 h bzw. 72 h) sprunghaft an, während sich die Apoptose-Fraktion (noch) stabil zeigte. Für JIMT-1 ließen sich diese Ergebnisse reproduzieren, weswegen auf deren dezidierte Abbildung verzichtet wurde. Auch NK3.3 reagierten ähnlich, tendenziell vermeintlich weniger sensibel: Z. B. erforderte es eine höhere Konzentration an Paclitaxel (0,01-0,02 µg/ml), um NK3.3 in ihrem Zellzyklus zu stoppen.

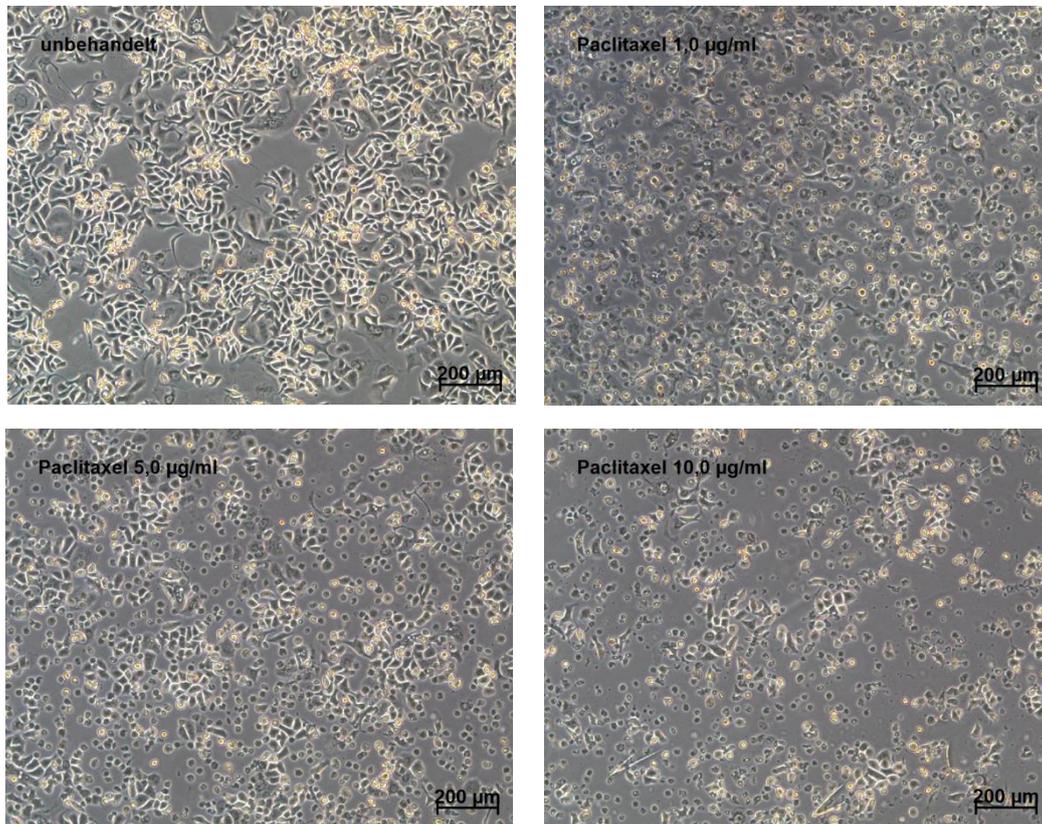


Abbildung 16: Mikroskopische Aufnahmen der ersten Paclitaxel-Titrationsreihe. Auf der ersten Aufnahme (links oben) sind nicht-behandelte Zellen der Her2⁺, Herceptin-sensiblen Linie SK-BR-3 abgebildet. Die folgenden Fotos zeigen vergleichend Zellen derselben Linie, die mit 1 µg/ml, 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml Paclitaxel (von links nach rechts) behandelt worden sind (48 h).

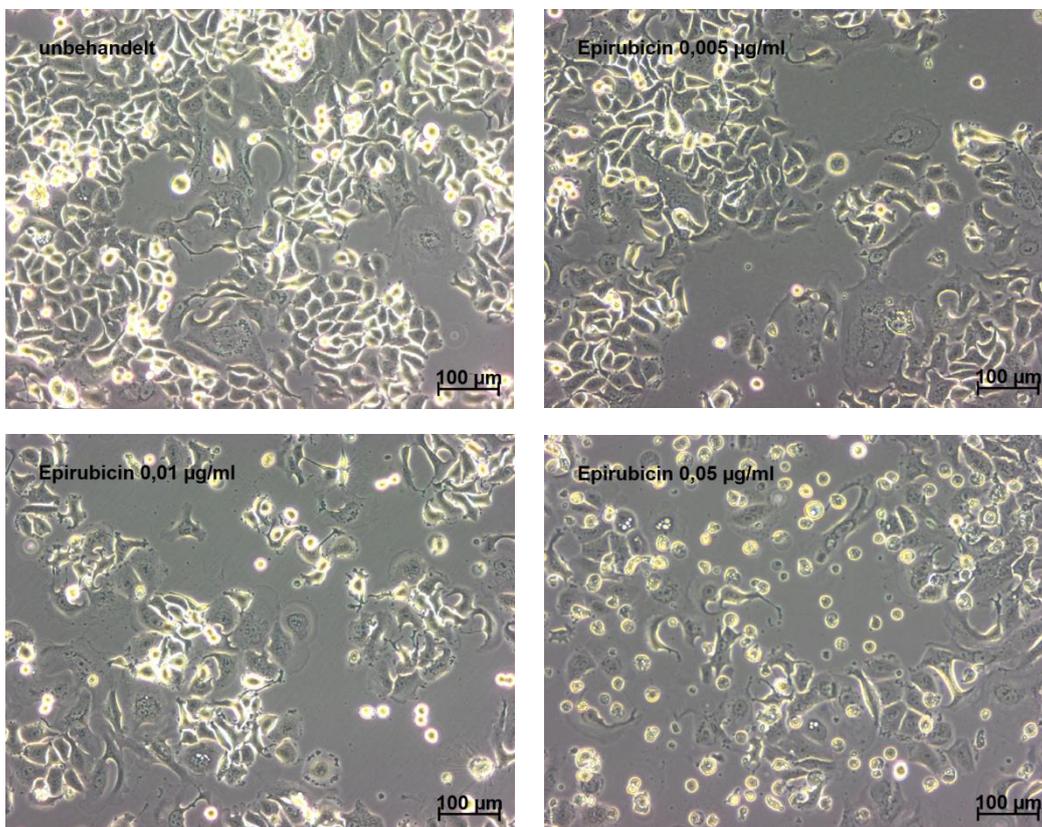


Abbildung 17: Mikroskopische Aufnahme einer der letzten Epirubicin-Titrationsreihen. Analog der vorherigen Bilderreihe zeigt das erste Bild (links oben) nicht-behandelte SK-BR-3. Auf den anderen Aufnahmen sind SK-BR-3-Kulturen zu sehen, die mit steigenden Dosen Epirubicin – 0,005 µg/ml, 0,01 µg/ml bzw. 0,05 µg/ml – stimuliert wurden (48 h).

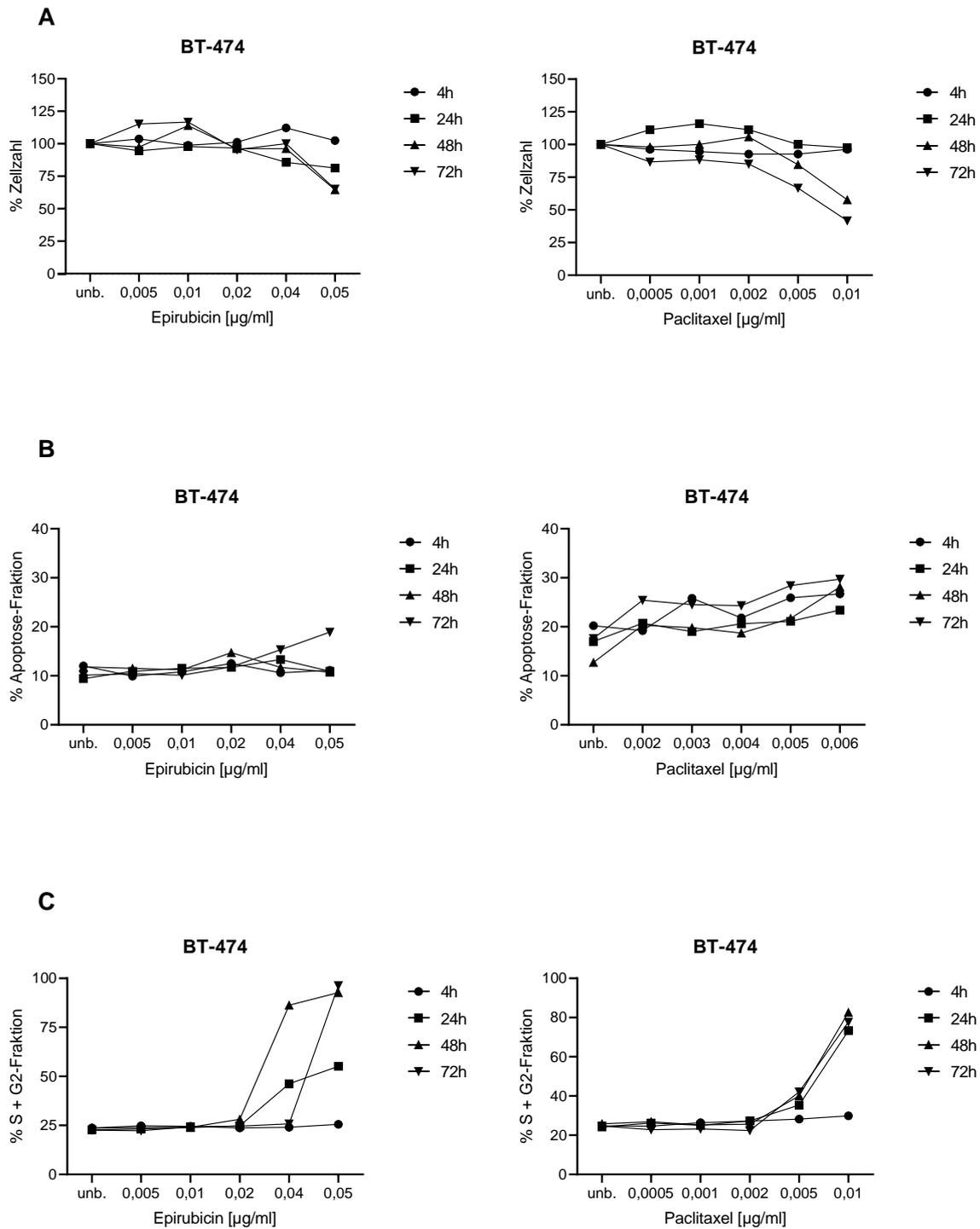


Abbildung 18: Titration von Epirubicin und Paclitaxel an der Targetzelllinie BT-474 (exemplarisch). Dargestellt sind die Ergebnisse der (A) Zellzahl-Bestimmung (in % der unbehandelten Kontrolle), der (B) Apoptose- (Annexin V/FITC-Assay) und der (C) S + G2-Phase-Messung (DAPI-Assay) von BT-474 nach 4-, 24-, 48- und 72-stündiger Behandlung mit steigenden Konzentrationen Epirubicin (linke Spalte) bzw. Paclitaxel (rechte Spalte).

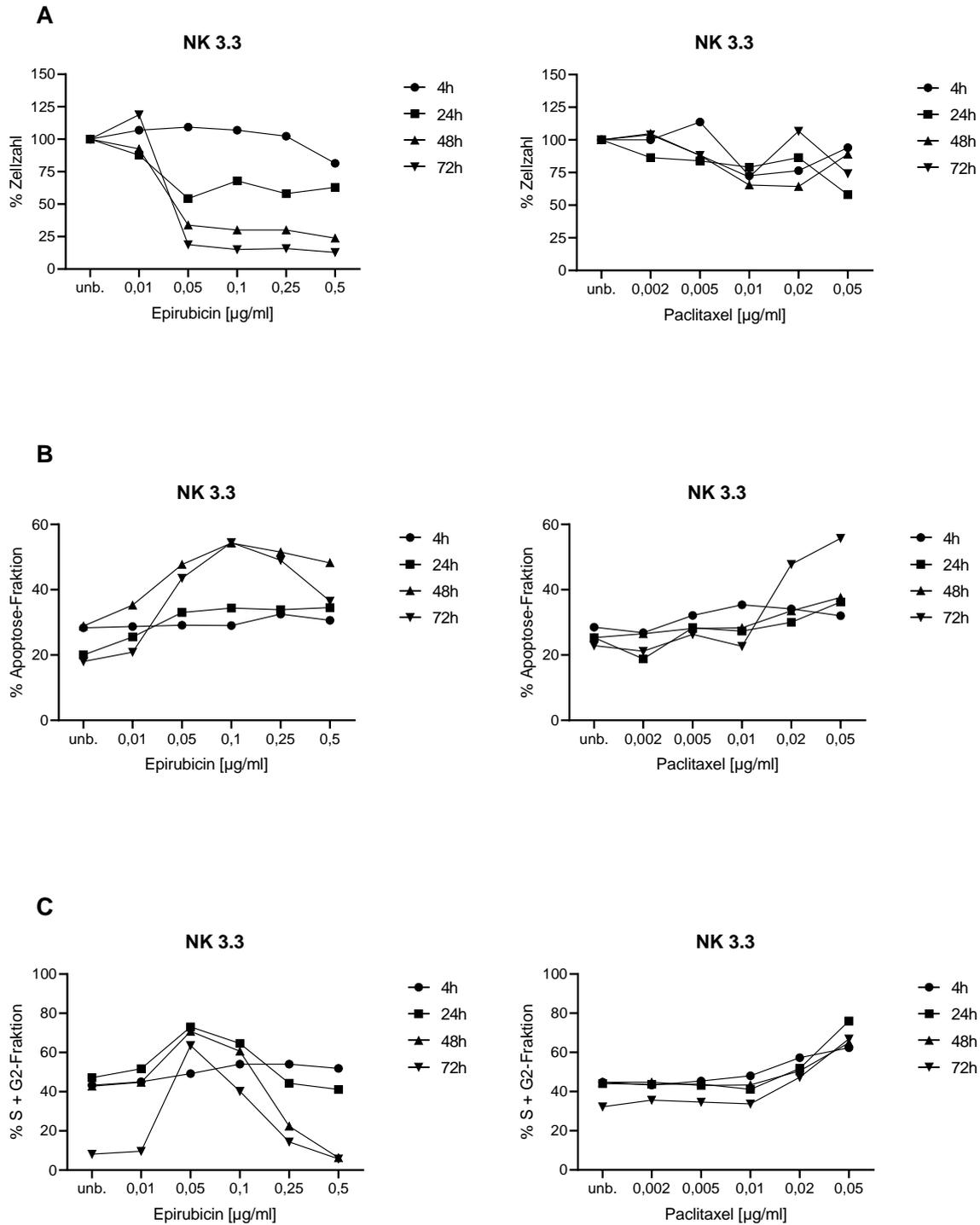


Abbildung 19: Titration von Epirubicin und Paclitaxel an der Effektorzelllinie NK3.3 (exemplarisch). Dargestellt sind die Ergebnisse der (A) Zellzahl-Bestimmung (in % der unbehandelten Kontrolle), der (B) Apoptose- (Annexin V/FITC-Assay) und der (C) S + G2-Phase-Messung (DAPI-Assay) von NK3.3 nach 4-, 24-, 48- und 72-stündiger Behandlung mit steigenden Konzentrationen Epirubicin (linke Spalte) bzw. Paclitaxel (rechte Spalte).

Die ermittelten Enddosen lagen also letztlich – bei ähnlicher Sensibilität der drei Zelllinien – 25- bzw. 2000-fach niedriger als die initialen Konzentrationen, nämlich bei 0,02 µg/ml für Epirubicin und bei 0,005 µg/ml für Paclitaxel.

Nachdem die Epirubicin- bzw. Paclitaxel-Endkonzentration definiert worden war, zielten die eigentlichen Experimente darauf ab, die (neo-)adjuvante Therapie mit Herceptin ± einem Anthracyclin bzw. einem Taxan (First-Line-Regime) im Her2⁺ Kokulturmodell zu simulieren, um potentielle Effekte der konventionellen Chemotherapie auf die ADCC aufzudecken.

Den im Folgenden erörterten Ergebnissen liegen dabei zwei bis vier unabhängige Experimente zugrunde (Ausnahmen: Perforin-/IFN- γ -Produktion und Protein-Profilung durch *Sciomics*). Die statistische Analyse und graphische Darstellung der Daten in Form von Diagrammen erfolgte unter Verwendung von GraphPad Prism (one-way oder two-way ANOVA, für multiples Testen Tukey's oder Sidak's Test). Angegeben sind Mittelwerte \pm SD (Standardabweichung). Bei einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde die Nullhypothese verworfen und detektierte Differenzen als statistisch signifikant interpretiert (*: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$; ****: $p \leq 0,0001$). Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Therapeutika und die Target-/Effektorzellen in den Graphen – und z. T. auch im Fließtext – wie folgt abgekürzt: AK = Antikörper/T = Trastuzumab (hier: synonym), E = Epirubicin, P = Paclitaxel, BT = BT-474, JIMT = JIMT-1, MDA = MDA-MB-453, NK = NK3.3, MNC = CBMC.

4.2. Kokultur-Versuche mit NK3.3 als Effektorzellen

Der Einfluss der Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die direkte bzw. indirekte, antikörperabhängige Killing-Aktivität der NK-Zellen wurde durchflusszytometrisch an der Induktion von Zelltod in den Zielzellen bemessen. Zur Quantifizierung des Zielzelltodes wurde der Apoptose (Annexin V/FITC)-Assay verwendet („Apoptose-Fraktion [%]“).

4.2.1. 1:1 Kokultur mit BT-474

Pro Versuchsreihe wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (24 h/48 h/72 h) je sechs Bedingungen in Mono- (BT, BT + E, BT + P, BT + T, BT + T + E, BT + T + P) und in Kokultur (BT + NK, BT + NK + E, BT + NK + P, BT + NK + T, BT + NK + T + E, BT + NK + T + P) getestet (vgl. Abb. 20).

4.2.1.1. Ergebnisse aus den Monokulturen

In der reinen Tumorzellkultur gehen zu den drei Zeitpunkten im Mittel $7,4 \pm 0,5$ % der Her2⁺-Zellen zugrunde (vgl. Abb. 20). Ein Vergleich der nicht-stimulierten mit der Epirubicin-stimulierten Monokultur legt keinen Epirubicin-Effekt offen. Ebenso übt Herceptin weder allein noch kombiniert mit Epirubicin einen Einfluss. Paclitaxel-behandelte BT-474 legen zu den beiden frühen Zeitpunkten um ca. 3 % gegenüber unbehandelten BT-474 zu, zum 72-h-Zeitpunkt liegt die Frequenz untergehender Zellen um ca. 7 % höher. Kombiniert mit Herceptin ergeben sich mit einer Steigerung von bis zu ca. 7 % zum 72-h-Zeitpunkt ähnliche Änderungen. Die Mittelwerte der Monokulturen bewegen sich in einem eher engen Bereich. Eine minimale Zelltod-Induktion kann lediglich bei den Paclitaxel-behandelten BT-474 (BT + P, BT + T + P) vermutet werden.

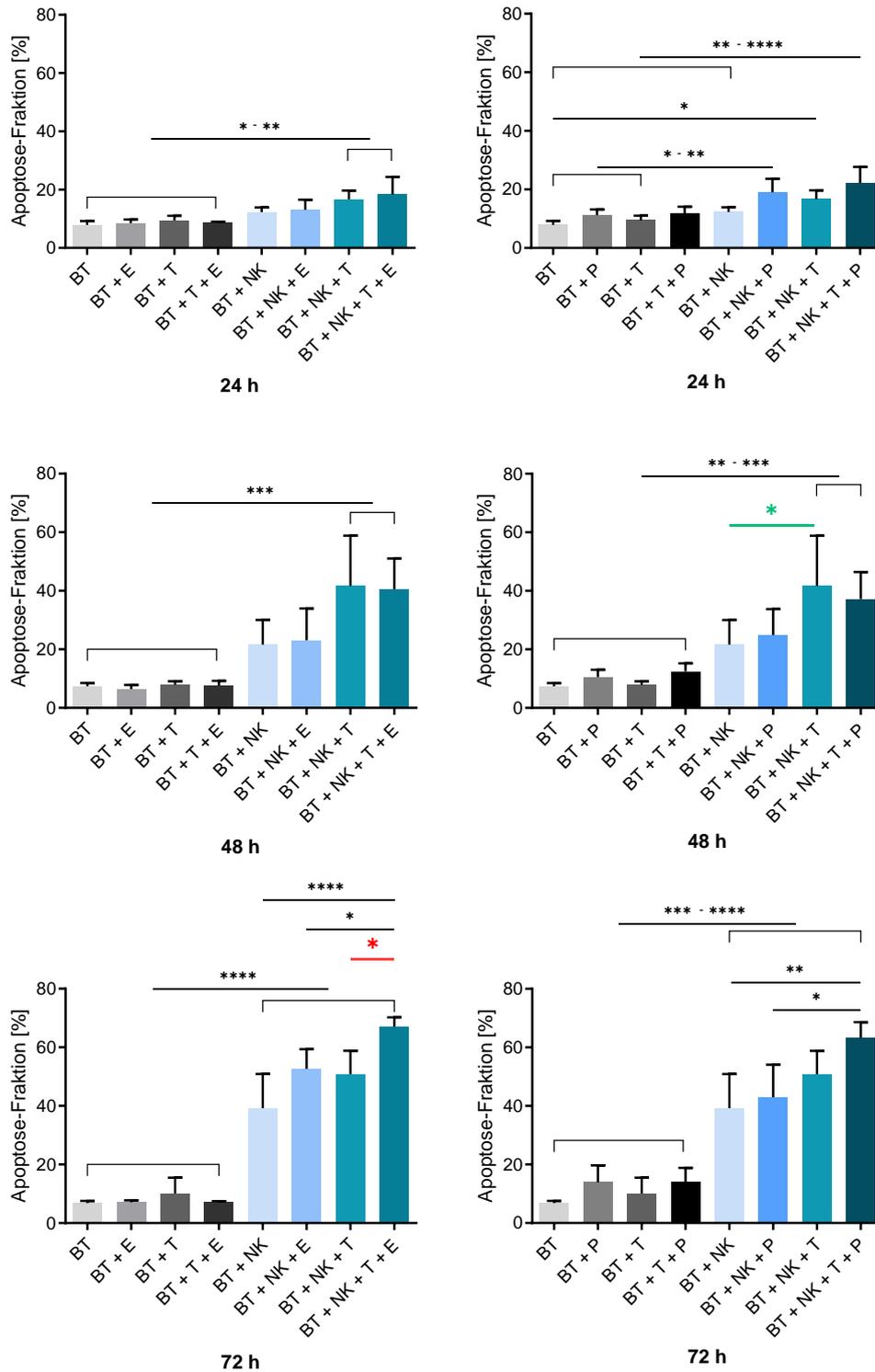


Abbildung 20: Apoptoseinduktion (Annexin V/FITC-Assay) in BT-474 (1:1 Kokultur, 24 h/48 h/72 h) in Abhängigkeit der zwölf Bedingungen nach 24 h, 48 h und 72 h. Der besseren Ergebnis-Übersicht wegen sind die zwölf Bedingungen auf einen Epirubicin- (linke Spalte) und einen Paclitaxel-Graphen (rechte Spalte) aufgetrennt, wobei die Kontrollbedingungen bzw. -balken – BT, BT + T, BT + NK, B + NK + T – bei beiden Graphen dieselben sind. Die Standardabweichungen (= SD) aus vier unabhängigen Experimenten werden durch Fehlerbalken wiedergegeben. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen. Sind (aus Gründen der Übersichtlichkeit) Gruppen eingeklammert, bedeutet das, dass gegenüber jedem der Gruppenmitglieder eine statistische Signifikanz beschrieben werden soll. Zwei dieser statistischen Signifikanzen

sind farblich hervorgehoben: Die grüne Gerade zeigt den statistisch signifikanten ADCC-Effekt und die rote Gerade die statistisch signifikante Induktion durch Epirubicin an.

4.2.1.2. Ergebnisse aus den 1:1 Kokulturen

Deutliche Differenzen zeigen sich hingegen zw. den einzelnen Kokultur-Bedingungen und insb. für den Vergleich der Kokultur- mit den Monokultur-Mittelwerten. Werden die Tumorzellen mit der Effektorzelllinie NK3.3 koinkubiert, steigt die Frequenz untergehender Her2⁺ Zielzellen kontinuierlich mit der Kultivierungszeit: nach 24 h liegt sie bei ca. 12 % ($12,3 \pm 1,6$ %), 24 h später fast doppelt ($21,6 \pm 8,5$ %) und 24 h danach dreimal ($39,3 \pm 11,6$ %) so hoch. Zum 72-h-Zeitpunkt ist die Zelltod-Induktion durch die zugegebenen NK-Zellen auch statistisch gegenüber allen Monokulturen signifikant.

Wird Epirubicin zur Kokultur zugegeben, ändert das anfangs nichts. Erst nach 72-stündiger Epirubicin-Exposition setzt sich die BT + NK + E-Kokultur mit einem (nicht signifikanten) Plus von 13 Prozentpunkten gegenüber der unbehandelten BT + NK-Kokultur ab ($52,7 \pm 6,7$ % vs. $39,3 \pm 1,6$ %). Wird Paclitaxel zugesetzt, nimmt die Rate zugrunde gehender Zellen zu jedem der drei Zeitpunkte nur gering gegenüber der reinen Kokultur zu (+ 6,7 % nach 24 h, + 3,3 % nach 48 h, + 3,7 % nach 72 h) – anfangs zwar minimal mehr als im Epirubicin-Ansatz, aber diese Beziehung kippt zum 72-h-Zeitpunkt, wo nun die BT + NK + E- die BT + NK + P-Kokultur um ca. 10 Prozentpunkte übertrifft. Gegenüber den sechs Monokulturen zeigt sich für die Epirubicin-stimulierte Kokultur – wie bei der reinen Kokultur – erst zum Zeitpunkt von 72 h eine Steigerung von statistischer Signifikanz ($p \leq 0,0001$). Für die Paclitaxel-behandelte Kokultur wird die Induktion von kontrolliertem Zelltod bereits nach 24 h gegenüber der unstimulierten, der Epirubicin-, der Herceptin- und der Epirubicin plus Herceptin-stimulierten Monokultur mit einem p-Wert $\leq 0,01$ eindeutig. Zum 72-h-Zeitpunkt ist die Steigerung – wie bei den anderen beiden – gegenüber jeder der Monokultur-Bedingungen statistisch signifikant ($p \leq 0,0001$).

Die antikörperabhängigen Effekte in Kokultur (ADCC) treten dagegen nach 48 h am deutlichsten zu Tage. Zum einen ist der Anteil apoptotischer Zellen in den Trastuzumab-Kokulturen (BT + NK + T: $50,8 \pm 8,0$) bereits nach 48 h statistisch deutlich signifikant gegenüber dem aller Monokulturen erhöht ($p \leq 0,01$), während das für alle anderen Kokulturen erst nach 72 h der Fall ist. Zum anderen ist der direkte Vergleich der Trastuzumab-therapierten Kokultur mit der nicht-therapierten Kokultur nur zum 48-h-Zeitpunkt signifikant ($p = 0,0384$; vgl. Abb. 20, grüne [Signifikanz-]Gerade). Nach 72 h tendieren die AK-freien Kokulturen aufzuholen.

Die Addition des Anthracyclins bzw. Taxans zur Antikörper-therapierten Kokultur zeitigt hingegen erst zum 72-h-Zeitpunkt augenfällige Effekte. (Zum 24-h-Zeitpunkt liegt die Apoptoserate knapp über, zum 48-h-Zeitpunkt knapp unter der in der Antikörper-therapierten-Kokultur.) Wird Paclitaxel zugefügt, nimmt der Anteil auf $63,2 \pm 5,4$ % zu, wird Epirubicin zugegeben auf $67,1 \pm 3,2$ gegenüber $50,8 \pm 8,0$ in der lediglich mit dem AK inkubierten Kokultur. Statistisch signifikant ist diese Differenz jedoch nur für Epirubicin ($p = 0,0192$, vgl. Abb. 20, rote [Signifikanz-]Gerade).

Das zweite Set von Graphen rückt die Kinetik der Zelltod-Induktion in den Fokus (vgl. Abb. 21). Auch hier wird insbesondere der Unterschied zwischen Mono- und Kokulturen offensichtlich. In Monokultur bewegen sich die Mittelwerte jeder Bedingung zu den drei Zeitpunkten annähernd auf gleicher Höhe, deutliche

zeitliche Tendenzen zeigen sich nicht. Die Zeitreihen in Kokultur lassen hingegen eine klare Staffelung erkennen. Hier steigt die Apoptosefraktion in Abhängigkeit der Laufzeit kontinuierlich an. Diese zeitliche Differenz ist für BT + NK, BT + NK + E, BT + NK + P für den 24-h- vs. 72-h- und den 48-h- vs. 72-h- und für BT + NK + T für den 24-h- vs. 48-h- und den 24-h- vs. 72-h-Vergleich, für die kombiniert behandelten Kokulturen, BT + NK + T + E und BT + NK + T + P, für die Vergleiche aller drei Zeitpunkte, 24 h vs. 48 h vs. 72 h, signifikant.

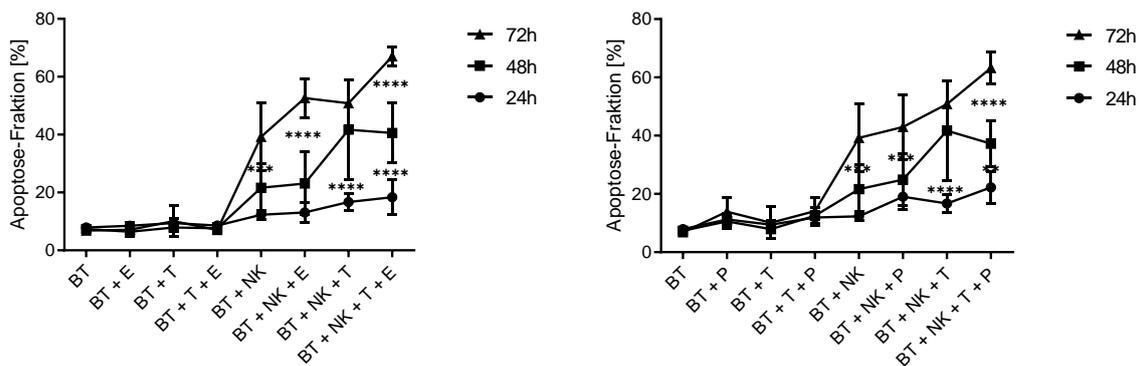


Abbildung 21: Kinetik der Apoptoseinduktion (Annexin V/FITC-Assay) in BT-474 in Abhängigkeit der zwölf Bedingungen (24 h/48 h/72 h). Der besseren Ergebnis-Übersicht wegen sind diese auf einen Epirubicin- und einen Paclitaxel-Graphen aufgeteilt, die Kontrollbalken (BT, BT + T, BT + NK, B + NK + T) aber bei beiden Graphen dieselben. Die eingezeichneten Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (= SD) aus vier unabhängigen Experimenten wieder. Statistische Signifikanzen sind durch Sternchen gekennzeichnet, aus Gründen der Übersichtlichkeit aber nicht alle eingezeichnet.

4.2.2. 5:1 Kokultur mit BT-474

Ob bzw. in welcher Dimension ADCC in vitro beobachtet werden kann, hängt v. a. auch von der Effektor:Target Ratio ab, die verglichen mit den Effektor- zu Zielzell-Beziehungen anderer Arbeiten mit 1:1 realistischer, aber relativ niedrig lag. Um ein – in puncto ADCC – potenteres Modell zu simulieren, wurden die beschriebenen Versuche daher auch mit einer E:T Ratio von 5:1 über 4 h und 24 h wiederholt, indem die NK-Zellichte von 0,2 auf $1,0 \times 10^6$ NK3.3-Zellen/Well korrigiert wurde. Die Ergebnisse wurden aus je zwei Versuchsreihen (n = 2) gemittelt (vgl. Abb. 22).

4.2.2.1. Ergebnisse aus den Monokulturen

Die Tumorzellichte wurde nicht justiert, sie stimmte mit der der 1:1 Reihe überein. Entsprechend sind die Monokultur-Ergebnisse der 5:1 wie 1:1 Reihe konsistent: Die Apoptoseraten tendieren zu beiden Zeitpunkten einheitlich knapp über und unter der Apoptoserate, die auch unbehandelte BT-474 zeigen (vgl. Abb. 22).

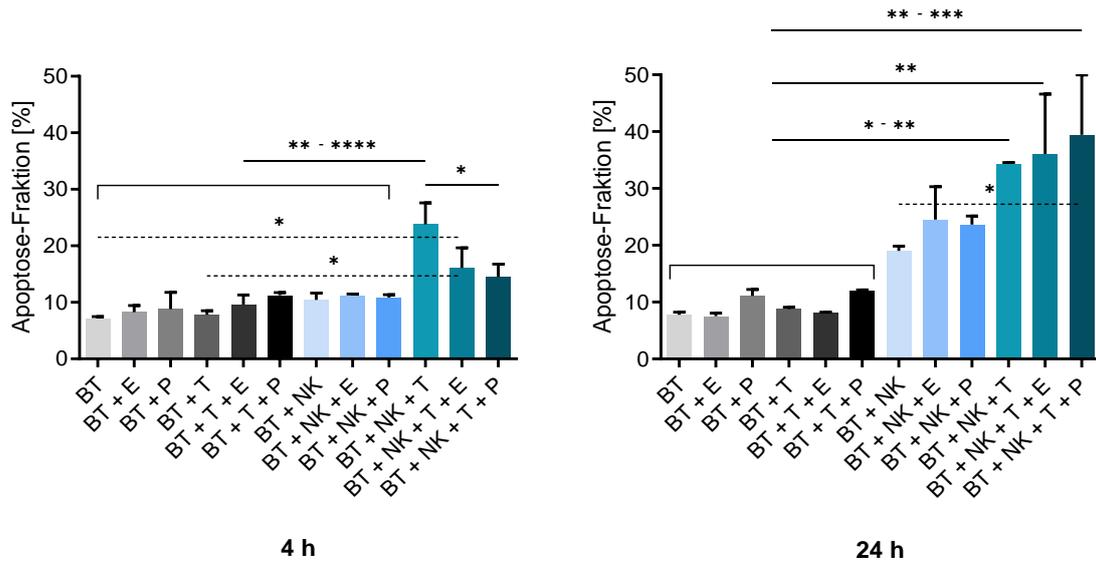


Abbildung 22: Apoptoseinduktion (Annexin V/FITC-Assay) in BT-474 (5:1 Kokultur) in Abhängigkeit der zwölf Bedingungen nach 4 h und 24 h. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (=SD) aus zwei unabhängigen Experimenten wieder. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen. Sind (aus Gründen der Übersichtlichkeit) Gruppen eingeklammert, bedeutet das, dass gegenüber jedem der Gruppenmitglieder eine statistische Signifikanz beschrieben werden soll.

4.2.2.2. Ergebnisse aus den 5:1 Kokulturen

Weiterhin evoziert weder die 5:1 Kokultivierung mit NK3.3 noch eine additive Anthracyclin- oder Taxan-Therapie nach 4 h eine entschiedene Änderung – anders als die Trastuzumab-Therapie. So steigt v. a. in der nur mit Herceptin-stimulierten Kokultur der Anteil apoptotischer Zellen auf statistisch signifikante $23,8 \pm 3,8 \%$ an. Die kombiniert stimulierten Kokulturen verfehlen den hohen Herceptin-Wert, erwirken aber noch eine erkennliche Erhöhung gegenüber dem Grundlevel sterbender Zellen in den reinen Tumorzellkulturen (ns; BT + NK + T + E: $16,1 \pm 3,5 \%$, BT + NK + T + P: $14,5 \pm 2,3 \%$). Der Sprung in der Herceptin-Kokultur ist mit einem p-Wert zw. 0,0015 und $\leq 0,0001$ gegenüber den Monokulturen und mit einem $p \leq 0,001$ gegenüber den Herceptin-freien Kokulturen erhöht. Für den Vergleich mit den kombinierten Bedingungen, wird die Nullhypothese für die „+ Epirubicin“- ($p = 0,06$) knapp nicht, für die „+ Paclitaxel“-Bedingung dagegen abgelehnt ($p = 0,017$).

Wird über ein Zeitfenster von 1 d inkubiert, fächern sich die Säulen dagegen weiter auf. Wie (nach 72 h) bei den 1:1 Kokulturen beschreibt das Säulendiagramm eine Treppe, deren Stufen sukzessive von der unstimulierten Kokultur ($19,0 \pm 0,9 \%$) über die Anthracyclin-/Taxan- ($24,5 \pm 5,8 \%$ bzw. $23,7 \pm 1,5 \%$) und die Antikörper-Therapie ($34,4 \pm 0,2 \%$) zu den kombinierten Therapieregimen hin ($36,1 \pm 10,5 \%$ bzw. $39,5 \pm 10,5 \%$) an Höhe zulegen. Für die Kokulturen mit Herceptin – ob einzeln oder mit „Chemo“ kombiniert – errechnet sich für diese Steigerung eine statistische Signifikanz gegenüber allen Monokultur-Ansätzen (min. $p \leq 0,01$). Unter den Kokulturen erlangt dagegen lediglich der Vergleich der kombiniert Paclitaxel-behandelten gegenüber der unbehandelten Kokultur statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

Stellt man einen Vergleich zwischen der 1:1 und der 5:1 Kokultur an, zeigt sich, dass die Erhöhung der Effektorzellen pro Zielzelle – ungeachtet der Behandlung – jeweils mit vermehrtem Zellsterben/-tod einhergeht: In den AK-freien verglichen mit den AK-haltigen Kokulturen aber nur gering, weswegen die Zelltodinduktion v. a. der antikörperabhängigen NK-Zell-Zytotoxizität attribuiert werden kann. In den drei Trastuzumab-therapierten Ansätzen ist „Apoptose“ infolge der E:T Erhöhung jeweils statistisch signifikant gesteigert ($p < 0,001$ bzw. $p < 0,0001$; vgl. Abb. 23).

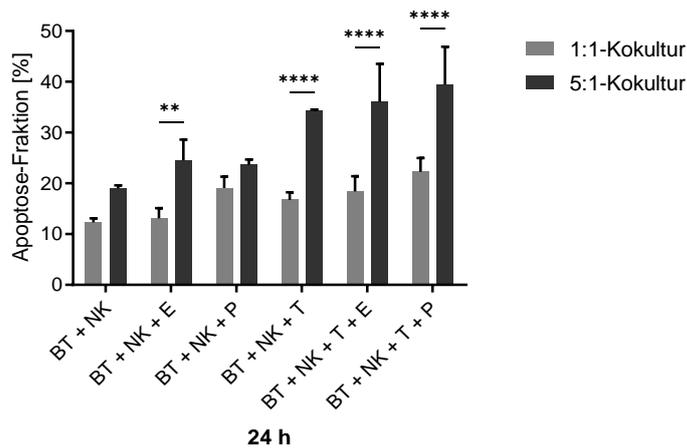


Abbildung 23: Vergleich der Apoptoseinduktion in der 1:1 Kokultur mit der in der 5:1 Kokultur nach 24 h. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen (= SD) aus den zwei (5:1) bzw. vier (1:1) unabhängigen Experimenten an. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen.

4.2.3. Alternative Targetzellen

Die an BT-474 etablierten 1:1 Kokultur-Modelle, wurden in je zwei Versuchsreihen ($n = 2$) an zwei weiteren Brustkrebszelllinien erprobt, die hinsichtlich ihres Her2-Expressionsprofils und ihrer Herceptin-Empfindlichkeit von der BT-474 Linie differieren.

4.2.3.1. JIMT-1 als Targetzellen

Dafür wurde u. a. auf die JIMT-1 Linie zurückgegriffen, die den Her2-Rezeptor überexprimiert (Amplifikation des ERBB2-Gens), jedoch resistent gegenüber Herceptin ist.

Ergebnisse aus den Monokulturen

Werden JIMT-1 mit einem der drei Arzneimittel – allein oder in kombinierter Anwendung – behandelt, können im Vergleich zur nicht-stimulierten Monokultur ($7,6 \pm 0,3$ %) hinsichtlich der Induktion von Zelltod weder wesentliche ansatz- noch zeitabhängige Differenzen detektiert werden (vgl. Abb. 24, linke Spalte).

Ergebnisse aus den 1:1 Kokulturen

Sind sie den NK3.3 exponiert, gehen diese hingegen sehr effizient gegen sie vor. Dies bezeugt die erhebliche Erhöhung des Anteils an apoptotischen Ereignissen, die mit der Expositionszeit korreliert: nach 24 h wächst er auf das 3-fache ($24,2 \pm 6,5$ %; ns), nach 48 h auf das 5 bis 6-fache ($42,8 \pm 3,3$ %; $p = 0,0116$) und nach 72 h auf das 8-fache ($60,2 \pm 10,5$ %, $p = 0,0013$) des Ausgangswertes – JIMT-1 in Monokultur – an. Auf die additiven Arzneien sprechen die JIMT-1 aber auch in Kokultur nicht an. Wie in der Monokultur erwirken sie keine weitere Steigerung. Statistisch signifikant ist, dass der Anteil apoptotischer JIMT-1 nach 72 h in (fast) allen Ansätzen der Kokultur gegenüber denen der Monokultur gesteigert ist (min. $p \leq 0,05$; Ausnahme: JIMT

+ E vs. JIMT + NK + E). Für die Mittelwertvergleiche der einzelnen Monokultur- und der einzelnen Kokultur-Bedingungen untereinander ergeben sich dagegen keine statistischen Signifikanzen.

4.2.3.2. MDA-MB-453 als Targetzellen

Mit MDA-MB-453 wurde zudem eine Zelllinie eingesetzt, die im klinischen Setting für „Herceptin-ungeeignet“ befunden wird, da sie Her2 zwar exprimiert, aber nicht relevant überexprimiert (keine Amplifikation des ERBB2-Gens).

Ergebnisse aus den Monokulturen

Unter den unbehandelten, über Her2 diskriminierten Tumorzellen bewegt sich die Frequenz untergehender Events zu den drei Zeitpunkten um 15 % ($15,0 \pm 0,9$ %). Bei den behandelten Tumorzellen onduliert sie ebenso um diesen Wert, die Unterschiede bleiben zu jedem der drei Endpunkte unter 5 % (vgl. Abb. 24, rechte Spalte). D. h. auch bei MDA-MB-453 zeigt Trastuzumab keine Wirksamkeit.

Ergebnisse aus den 1:1 Kokulturen

Während bei den beiden anderen Targetzelllinien bereits die Kokultivierung mit den NK-Zellen Tumorzellsterben induziert, ist dies bei dieser Zelllinie nicht der Fall. Nach 24 h lassen sich hier weder für die Mono- noch für die Kokulturen Trends ablesen. Erst nach 48 h zeichnen sich für die Kokulturen erste Effekte ab, die aber (noch) keine statische Signifikanz erlangen: Herceptin alleine übt keinen Einfluss (keine ADCC). Für Epirubicin (\pm Herceptin) deutet sich ein sehr geringer, für Paclitaxel (\pm Herceptin) immerhin ein geringer Effekt an. Zum 72-h-Zeitpunkt werden diese Tendenzen jedoch eindeutig: zwar kann in der unbehandelten und auch in der AK-behandelten Kokultur noch immer keine (relevante) Zelltod-Induktion (kein ADCC-Effekt) nachvollzogen werden, dafür aber in den Chemo-therapierten Kokulturen (\pm Herceptin). V. a. die Addition von Paclitaxel zur Kokultur (\pm Herceptin) induziert einen „Zelltod-Sprung“, der statistisch signifikant ist. Denn der Anteil zugrunde gehender Zellen verdoppelt sich knapp (MDA + NK: $21,2 \pm 6,1$ % \rightarrow MDA + NK + P: $54,9 \pm 0,9$ % bzw. MDA + NK + T: $27,8 \pm 4,7$ % \rightarrow MDA + NK + T + P: $55,7 \pm 5,8$ %).

Da bei beiden Zelllinien kein relevanter ADCC-Effekt beobachtet werden konnte, schienen sie für (eingehendere) Studien des Einflusses einer Anthracyclin-/Taxantherapie auf die ADCC nicht geeignet. Deswegen wurde für die Folgeversuche, die auf die NK-Zellen fokussierten, zur BT-474-Linie zurückgekehrt.

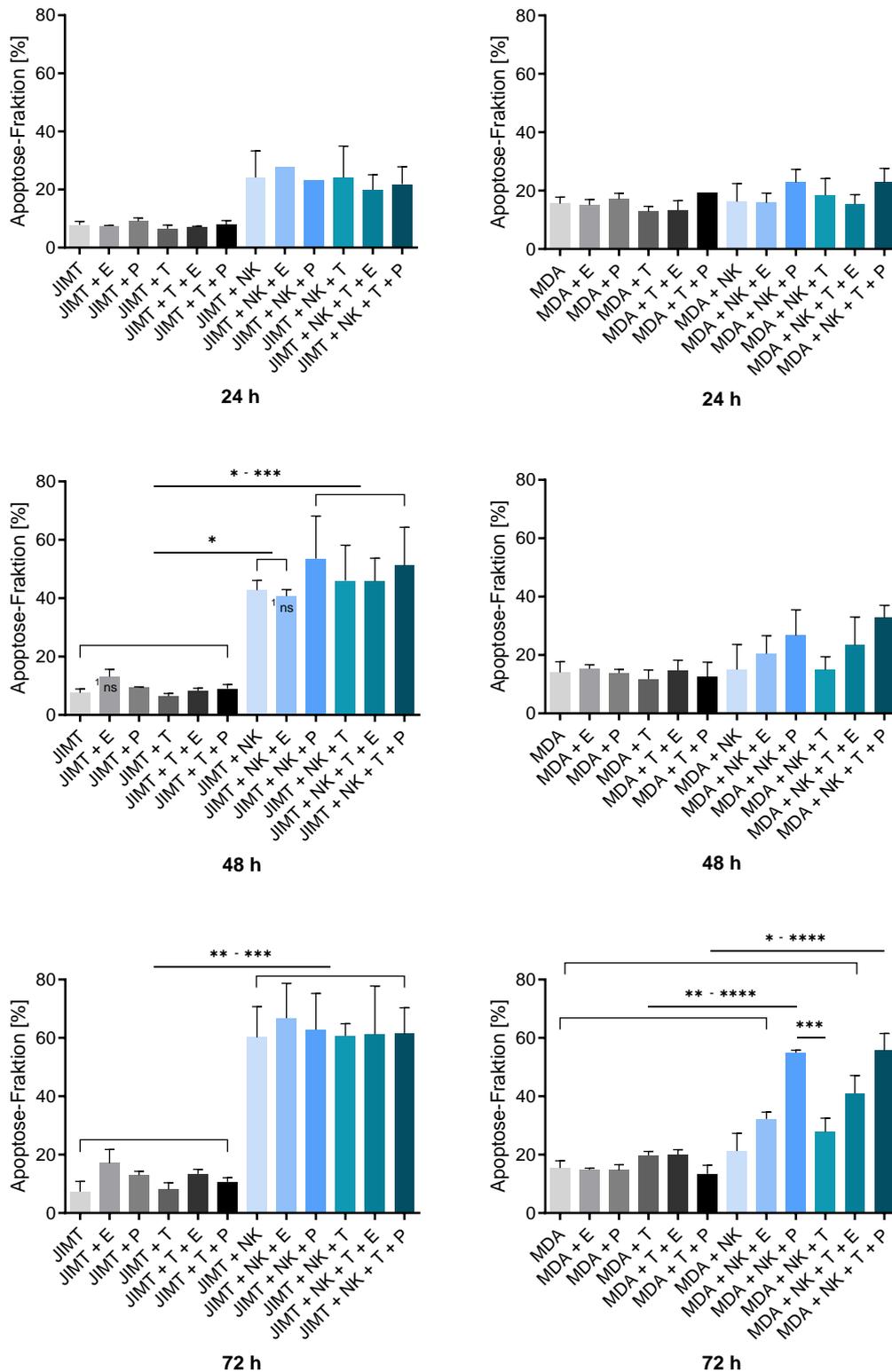


Abbildung 24: Apoptoseinduktion (Annexin V/FITC-Assay) in JIMT-1 (linke Spalte) bzw. MDA-MB-453 (rechte Spalte) in Abhängigkeit der zwölf Bedingungen nach 24 h, 48 h und 72 h. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (= SD) aus zwei unabhängigen Experimenten wieder. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen. Gekennzeichnet wurden nur ausgewählte Signifikanzen. Sind (aus Gründen der Übersichtlichkeit) Gruppen eingeklammert, bedeutet das, dass gegenüber jedem der Gruppenmitglieder eine statistische Signifikanz beschrieben werden soll. Eine Ausnahme gilt für die Varianzanalyse zwischen JIMT + E und JIMT + NK + E (jeweils markiert mit einer 1) zum 48-h-Zeitpunkt, die keine statistische Signifikanz ergab (gekennzeichnet durch das Kürzel „ns“).

4.2.4. Phänotyp der NK-Zellen

Der Vergleichbarkeit wegen waren die vier unabhängigen Experimente ($n = 4$), die der Phänotypisierung der NK-Zellen dienten, wie die einleitend erörterten 1:1 (BT-474:NK3.3) Kokultur-Experimente konzipiert. Zur Kontrolle wurden unbehandelte und Epirubicin- bzw. Paclitaxel-behandelte NK3.3 Zellen mitgeführt. Auf eine Herceptin-Kontrolle konnte verzichtet werden, da AG-interne Daten eine Beeinflussung des NK3.3-Expressionsprofils durch Herceptin bereits widerlegt hatten.

Die Diskriminierung von Zellebris und -doubletten unter den gemessenen Ereignissen wurde durch zwei SSC-/FSC-korrelierende Density-Plots (SSC-A/FSC-A \rightarrow SSC-A/FSC-W) erreicht. Ein dritter Density-Plot diente der Identifizierung der NK-Zellen unter den eingegrenzten „Einzelzellen“, die über einen gegen NKp46 gerichteten, APC-gekoppelten AK detektiert wurden. Diese NKp46-gegatete Zellwolke wurde auf die Koexpression vier weiterer Antigene, die die Reifung und Aktivierung der NK-Zellen reflektieren, analysiert: CD56, CD16, CD27 und CD137 (vgl. auch Kap. 3.4.4.). Je Bedingung wurde eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt, die keine gegen die interessierenden Epitope, sondern gegen IgG1 κ gerichtete AK enthielt und unspezifische Bindungen aufdeckte. Orientiert an der Zellverteilung dieser Kontrolle, wurden Fenster definiert, die die durch die unspezifischen Bindungen suggerierten positiven Ereignisse exkludierten ($< 1\%$). Untersucht wurde, welcher Anteil (%) der NK-Zellen eines der CD-Antigene und in welcher Intensität (MFI bzw. SI) sie die einzelnen Marker exprimieren. Insbesondere sollte überprüft werden, ob sich dieses CD-Expressionsprofil in Abhängigkeit der Bedingungen änderte und infolge Rückschlüsse auf immunsupprimierende oder -stimulierende Einflüsse zuließe.

Die Expression der vier CD-Antigene auf den via NKp46 identifizierten Zellen – hier mit NK3.3 gleichgesetzt – zeigte sich nur unwesentlich von den verschiedenen Bedingungen beeindruckt (vgl. Abb. 25). Rund $90,0 \pm 3,3\%$ der nicht-behandelten NKp46⁺ Zellen koexprimieren CD56, das daher (auch i. A.) oft derer Identifikation dient (MFI CD56/V450: $901,7 \pm 112,0$). Für CD16, den aktivierenden Fc γ -Rezeptor IIIA zeigen sich im Mittel $26,1 \pm 4,7\%$ der nicht-behandelten NKp46⁺ Zellen positiv (MFI CD16/PE: $1715,3 \pm 563,4$). CD27 und CD137 werden hingegen nicht nennenswert von diesen exprimiert (CD27: $4,9 \pm 1,9\%$; CD137: $2,2 \pm 0,9\%$). Einzig zum 72-h-Zeitpunkt weichen zwei Bedingungen statistisch signifikant ab: In der kombiniert mit Herceptin und Epirubicin-therapierten Kokultur (BT + NK + T + E)-Bedingung liegt der Anteil an CD56⁺ NK-Zellen gegenüber allen anderen – außer der Epirubicin-therapierten Kokultur (BT + NK + E) – niedriger ($p \leq 0,01$: NK, BT + NK + T; $p \leq 0,05$: NK + E, NK + P, BT + NK + P, BT + NK + T + P). Die zweite statistisch signifikante Varianz betrifft CD16: Nach 72-stündiger Epirubicin-Behandlung liegt die Rate an CD16-exprimierenden NK-Zellen (NK + E) höher als in allen anderen Bedingungen ($p \leq 0,01$: NK, BT + NK, BT + NK + P, BT + NK + T + P; $p \leq 0,05$: NK + P, BT + NK + E, BT + NK + T, BT + NK + T + E).

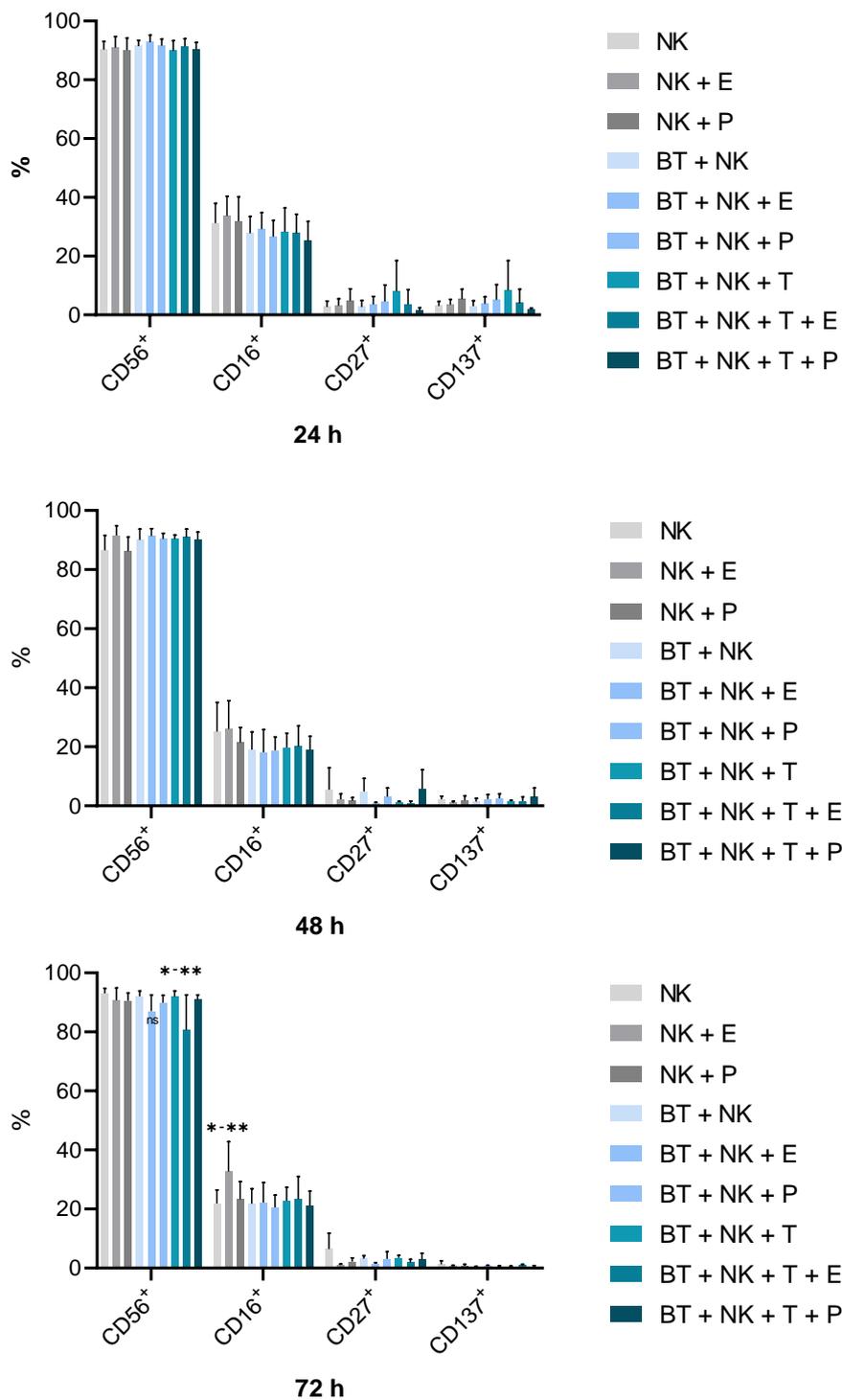


Abbildung 25: Phänotypisierung der über NKp46 identifizierten NK-Zellen in Abhängigkeit der neun Bedingungen (24 h/48 h/72 h) hinsichtlich der „Expression“ von CD56, CD16, CD27, CD137: relativer Anteil (%) an CD-positiven Zellen. Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (= SD) aus vier unabhängigen Experimenten wieder. Die (aus Gründen der Übersichtlichkeit) direkt über den Balken/Bedingungen eingezeichneten Sternchen sollen statistische Signifikanzen gegenüber allen anderen Bedingungen beschreiben, wobei die mit dem Kürzel „ns“ (nicht signifikant) gekennzeichnete Bedingung ausgenommen ist.

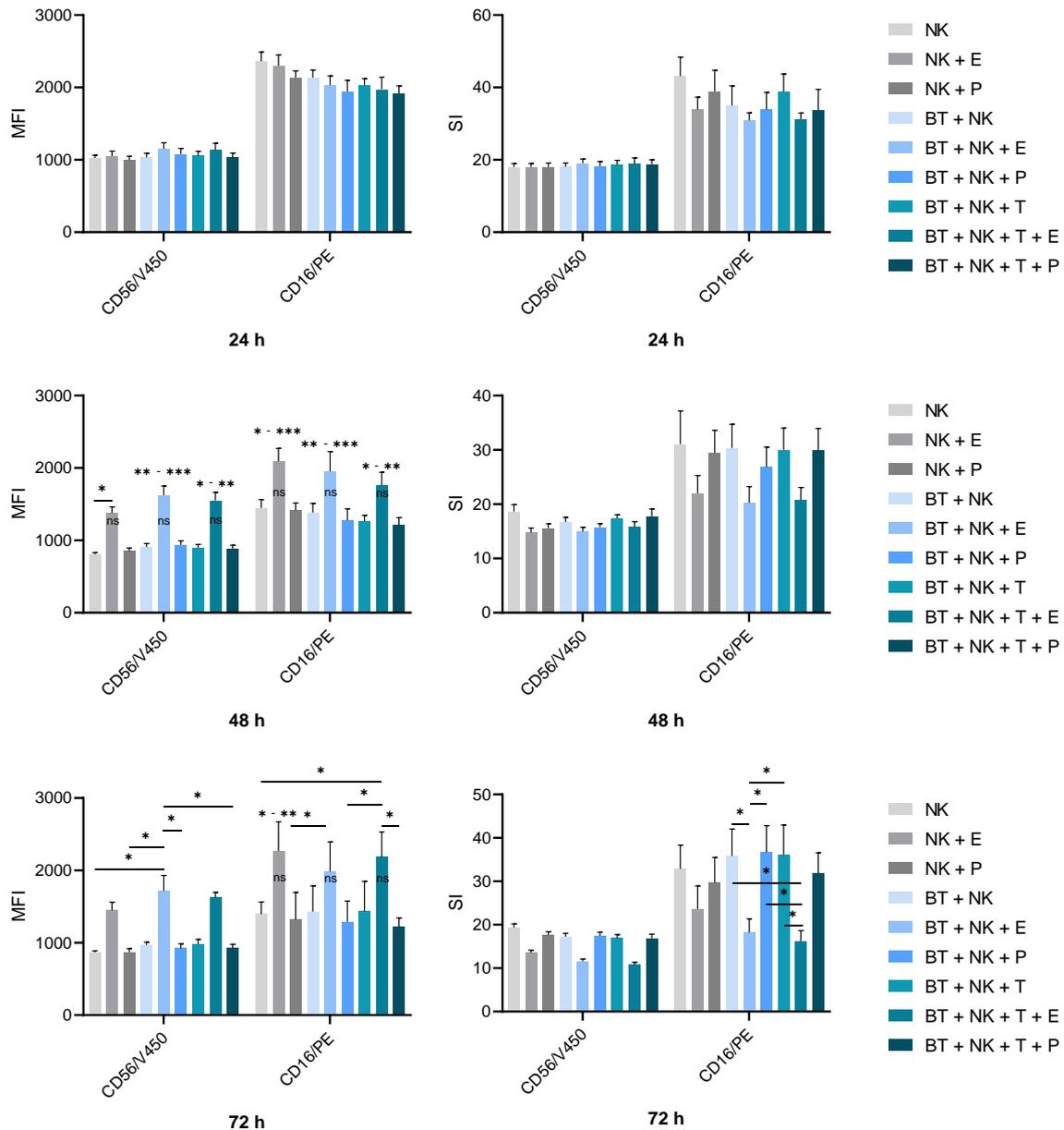


Abbildung 26: Phänotypisierung der über Nkp46 identifizierten NK-Zellen in Abhängigkeit der neun Bedingungen (24 h/48 h/72 h) hinsichtlich der „Expressionsstärke“ von CD56/V450 und CD16/PE: mean fluorescence intensities (MFI, linke Spalte) und stain indices (SI, rechte Spalte). Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (= SD) aus vier unabhängigen Experimenten wieder. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen. Sind die Signifikanz-Sternchen dagegen (aus Gründen der Übersichtlichkeit) direkt über einem der Balken eingezeichnet, bedeutet das, dass gegenüber allen anderen Bedingungen eine statistische Signifikanz beschrieben werden soll, wobei die mit dem Kürzel „ns“ (nicht signifikant) gekennzeichneten Bedingungen jeweils ausgenommen sind.

Neben einer Änderung des Anteils an CD56- und CD16-exprimierenden Zellen, interessierte aber auch eine Änderung der Intensität der CD56- und CD16-Expression. Hierfür wurden die MFI- und SI-Werte der an die AK gekoppelten Fluorochrome – Anti-CD56/V450 und Anti-CD16/PE – herangezogen (vgl. Abb. 26). Beide reflektieren die Menge an gebundenem Fluorochrom pro Zelle, wobei die MFI nur die Fluoreszenz „CD-exprimierender“ Zellen (positiver Peak), der SI hingegen deren Fluoreszenz und die Hintergrund-Fluoreszenz „nicht-exprimierender“ Zellen (negativer Peak, hier: Isotyp-Kontrolle) einbezieht (vgl. auch Kap. 3.4.4.).

Nach 48 h und 72 h treten bei derer Analyse deutliche Differenzen zu Tage. Denn dann übertrifft die MFI von *V450* (CD56) und *PE* (CD16) in allen Epirubicin-haltigen die in allen nicht-Epirubicin-haltigen Bedingungen (größtenteils statistisch signifikant, vgl. auch Abb. 26). Werden aber auch die Isotyp-Kontrollen berücksichtigt, fällt nach Epirubicin-Behandlung v. a. eine Steigerung der unspezifischen Fluoreszenz auf. Da diese in die Berechnung des SI (anders als in die der MFI) eingeht, zeichnet sich hier nach 48 h bzw. 72 h ein zur MFI inverses Bild ab. Denn der SI für *V450* (CD56) und *PE* (CD16) liegt dann in allen Epirubicin-behandelten verglichen mit allen nicht-Epirubicin-behandelten Bedingungen mindestens tendenziell niedriger (nach 72 h statistisch signifikant für BT + NK + E vs. BT + NK, B + NK + P, BT + NK + T und für BT + NK + T + E vs. BT + NK, BT + NK + P, BT + NK + T, vgl. auch Abb. 26). Diese Ergebnisse legen letztlich nahe, dass die höheren *fluorescence intensities* nach der Epirubicin-Behandlung eher auf eine gesteigerte unspezifische Hintergrund- als auf eine spezifische Fluoreszenz zurückzuführen sind.

4.2.5. Perforin- und IFN- γ -Produktion der NK-Zellen

Neben der Expression extrazellulärer wurde auch die intrazellulärer Proteine, die von Perforin und Interferon- γ (IFN- γ), vergleichend in drei Vorversuchen (n jeweils = 1) untersucht. NK-Zellen wurden wie auch i. R. der Phänotypisierung via anti-NKp46/APC, die beiden intrazellulären Proteine via anti-Perforin/FITC und anti-IFN- γ /BV421 Isotyp-kontrolliert identifiziert. Hinsichtlich derer Synthese verglichen wurden unbehandelte NK3.3 und NK3.3 in Kokultur (BT-474, 1:1) \pm Herceptin \pm Epirubicin (vgl. Abb. 27). Für den ersten Versuch wurden NK3.3 verwendet, die wie üblich mit IL-2 stimuliert wurden. Rund 75 % der NK3.3 produzieren (bereits in Ruhe) Perforin (73,8 % MFI Perforin/FITC: 1320), unter 5 % IFN- γ (3,8 %, MFI IFN- γ /BV421: 426). Die Kokultivierung und die Kokultivierung + Herceptin, nicht jedoch die Kokultivierung + Herceptin + Epirubicin, triggern die Perforin-Produktion tendenziell: Der Anteil an Perforin-positiven NK-Zellen nimmt darin auf 83,5 % (MFI Perforin/FITC: 1526; BT + NK) bzw. 91,1 % zu (MFI Perforin/FITC: 1786; BT + NK + T). Jedoch ist die Induktion gegenüber der konstitutiv hohen Synthese (unter IL-2) eher gering. Unter der Annahme NK3.3 könnten infolge ihrer kontinuierlichen IL-2-Stimulierung stets im „Killing-Modus“ sein, wurde daher ein IL-2-Entzugsversuch unternommen (24 h IL-2-Entzug vor Experimentbeginn). Unter IL-2-Entzug zeigte sich die Perforin- (und IFN- γ -) Produktion der NK3.3 deutlich reduziert (7,7 %, MFI Perforin/FITC: 754). Selbst wenn NK3.3 zum Zeitpunkt der Kokultivierung wieder mit IL-2 stimuliert wurden, blieb deren Perforin-Produktion hinter der der kontinuierlich IL-2 stimulierten NK3.3 zurück (20,1 %, MFI Perforin/FITC: 1019). V. a. aber half der Entzug nicht (wie erhofft), deutlichere Differenzen zwischen NK3.3 in Monokultur vs. NK3.3 in Kokultur \pm Herceptin \pm Epirubicin aufzudecken. Deswegen wurden diese Versuche nicht weiterverfolgt.

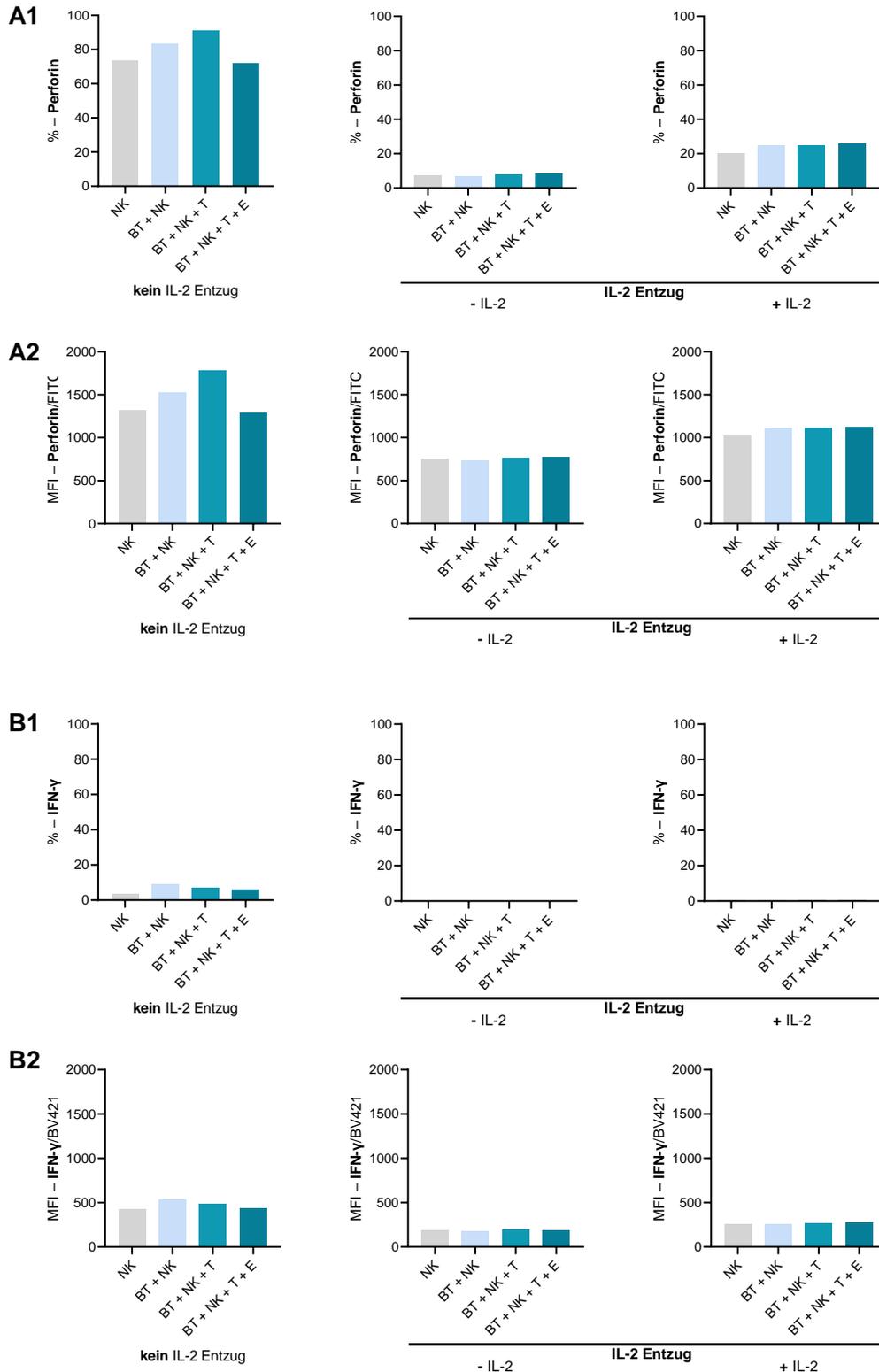


Abbildung 27: (A) Perforin- und (B) IFN- γ -Produktion der über NKp46 identifizierte NK-Zellen in Abhängigkeit der vier Bedingungen (6 h Kokultur, 5 h Golgi-Block). Für den ersten Versuch wurden IL-2 stimulierte NK-Zellen (kein IL-2-Entzug, linke Spalte) verwendet, für den zweiten und dritten Versuch NK-Zellen, denen im Vorfeld für 24 h IL-2 entzogen worden war (IL-2-Entzug, mittlere und rechte Spalte). Die NK-Zellen von Versuch zwei wurden nicht wieder, die von Versuch drei hingegen mit Beginn des Experimentes wieder IL-2 stimuliert. Dargestellt sind der relative Anteil (%) an **(A1)** Perforin- und **(B1)** IFN- γ -exprimierenden NK-Zellen und die Intensität (MFI) derer **(A2)** Perforin- und **(B2)** IFN- γ -Expression.

4.2.6. Proteinexpression der NK-Zellen

Die Zytokin- und Proteinprofilierung der NK-Zellen stützte sich außer auf FACS-Analysen auch auf einen Antibody-Array (*scioCD antibody array*, *Sciomics*).

Die Kokulturen mit der Herceptin-sensitiven, Her2⁺ Tumorzelllinie BT-474 (48 h) wurden vor der Proteinernste und -extraktion anti-ErbB2 depletiert. So konnte die Proteinexpression der NK-Zellen der Linie NK3.3, die mit den Tumorzellen konfrontiert waren, in Abhängigkeit von Herceptin, Epirubicin oder Herceptin kombiniert mit Epirubicin verglichen werden. Nach Separation mittels MACS wurde die Reinheit der (ErbB2⁻) Negativfraktion (\approx NK-Zellen) mittels FACS überprüft. Alle drei (ErbB2⁻) Negativfraktionen waren $\leq 1,2$ % mit der (ErbB2⁺) Positivfraktion (\approx Tumorzellen) kontaminiert.

Ansatz	Zellzahl	NKp46 ⁺	Her2 ⁺
unbehandelt (BT + NK)	1,9 x 10 ⁶	94,5 %	0,3 %
Trastuzumab (BT + NK + T)	1,9 x 10 ⁶	94,6 %	0,4 %
Trastuzumab + Epirubicin (BT + NK + T + E)	1,8 x 10 ⁶	91,9 %	1,2 %

Tabelle 25: Vergleich der drei ErbB2⁻ Negativfraktionen.

Gescreent wurde ein Panel von 81 CD-Antigenen und anderen relevanten Proteinen (*scioCD antibody array*, Datenakquisition und -analyse durch *Sciomics*). Die Gegenüberstellung der Trastuzumab-therapierten NK3.3-Gruppe und der nicht-therapierten NK3.3-Kontrollgruppe identifiziert 7 differentiell exprimierte Proteine mit $p \leq 0,05$ (vgl. Abb. 28). Mit Trastuzumab plus Epirubicin stimulierte NK3.3-Kokulturen weisen gegenüber der unstimulierten NK3.3-Kokultur 1 statistisch signifikant erhöht exprimiertes Protein (vgl. Abb. 29) und verglichen mit den Trastuzumab-therapierten NK3.3-Kokulturen 3 different exprimierte Proteine von statistischer Signifikanz auf (vgl. Abb. 30).

Die Ergebnisse dieser Vergleiche von je zwei Bedingungen sind in Übersichtslisten (Tab. 26-28) resümiert und in *Volcano-Plots* visualisiert (vgl. Abb. 28-30). In dieser Sonderform des Scatter-Plots steht jeder Spot für ein zwischen zwei verglichenen Bedingungen differentiell exprimiertes Protein. Indem die differentielle Expression auf einer log₂-skalierten x-Achse aufgetragen ist (log₂[fold change]), kommen gegenüber der Kontrollgruppe herunterregulierte Proteine links, hochregulierte Proteine rechts des x-Wertes 0 zum Liegen. Die -log₁₀-skalierte y-Achse, auf der die statistische Signifikanz aufgetragen ist (-log₁₀[adj. P-Value]), korreliert die differentielle Expression jedes Punktes mit dem zugehörigen p-Wert. Je niedriger der p-Wert eines Punktes, desto höher wird er – aufgrund der Auftragung als negativer dekadischer Logarithmus – im Graphen abgebildet. Eine horizontal laufende rote Linie zeigt das Signifikanzniveau von $p = 0,05$ an. Diese Darstellung rückt so die linke und rechte obere Ecke des *Volcano Plots* in den Fokus, wo die Spots größere Expressionsdifferenzen zeigen und signifikanter sind.

BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab vs. BT-474 + NK3.3

Protein	Antikörper	logFC	adj. p-value
pan HLA-class II	si_146	1.05	0,01429316
HLA-DR	si_144	0.79	0,01630909
HLA-DP	si_145	0.61	0,01429316
CD45RA	si_093	0.42	0,01429316
CD34	si_076	0.42	0,01429316
BDNF	si_153	0.28	0,01630909
CD63	si_118	0.26	0,00974804

Tabelle 26 (Sciomics): Zwischen BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab vs. BT-474 + NK3.3 (Kontrolle) statistisch signifikant differentiell exprimierte Proteine. Je positiver der logFC-Wert eines Proteins, desto mehr ist es gegenüber der Kontrolle hochreguliert – und umgekehrt je negativer, desto mehr ist es gegenüber der Kontrolle herunterreguliert (hier: sieben gegenüber der Kontrolle signifikant höher exprimierte Proteine). Die p-Werte wurden für multiples Testen korrigiert.

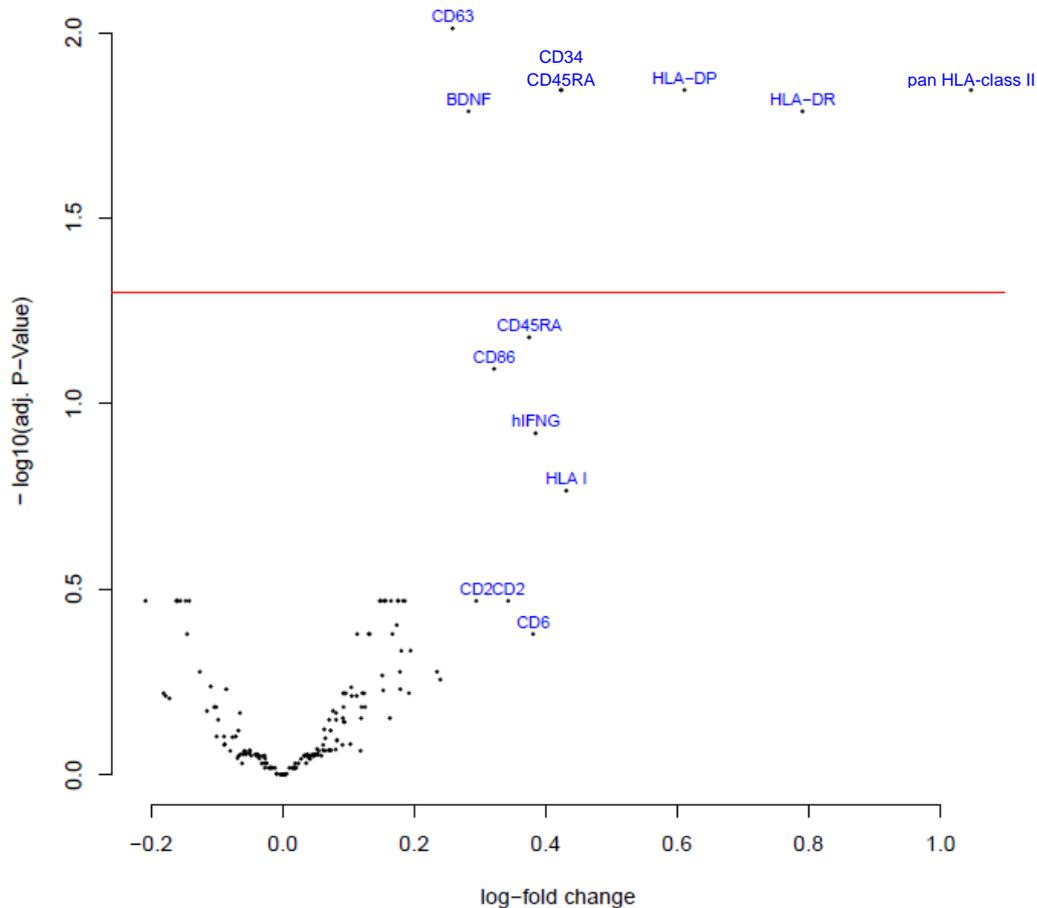


Abbildung 28 (Sciomics): Differentielle Proteinexpression zw. den Ansätzen BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab vs. BT-474 + NK3.3 (Kontrolle). Der Vergleich des Proteinprofils von NK3.3 im Trastuzumab-therapierten Ansatz mit dem von NK3.3 im Kontrollansatz identifiziert sieben statistisch signifikant hochregulierte Proteine: pan HLA-class II, HLA-DR, HLA-DP, CD45RA, CD34, BDNF und CD63. Denn gegenüber der Kontrollgruppe herunterregulierte Proteine kommen links, hochregulierte Proteine rechts des x-Wertes 0 zum Liegen, wobei diese differentielle Expression für Proteine oberhalb der roten, horizontalen Gerade von statistischer Signifikanz ist.

BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3

Protein	Antikörper	logFC	adj. p-value
Eotaxin-1	si_154	0.29	1.8e-02

Tabelle 27 (Sciomics): Zwischen BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3 (Kontrolle) statistisch signifikant differentiell exprimierte Proteine. Je positiver der logFC-Wert eines Proteins, desto mehr ist es gegenüber der Kontrolle hochreguliert – und umgekehrt je negativer, desto mehr ist es gegenüber der Kontrolle herunterreguliert (hier: ein gegenüber der Kontrolle signifikant höher exprimiertes Protein). Die p-Werte wurden für multiples Testen korrigiert.

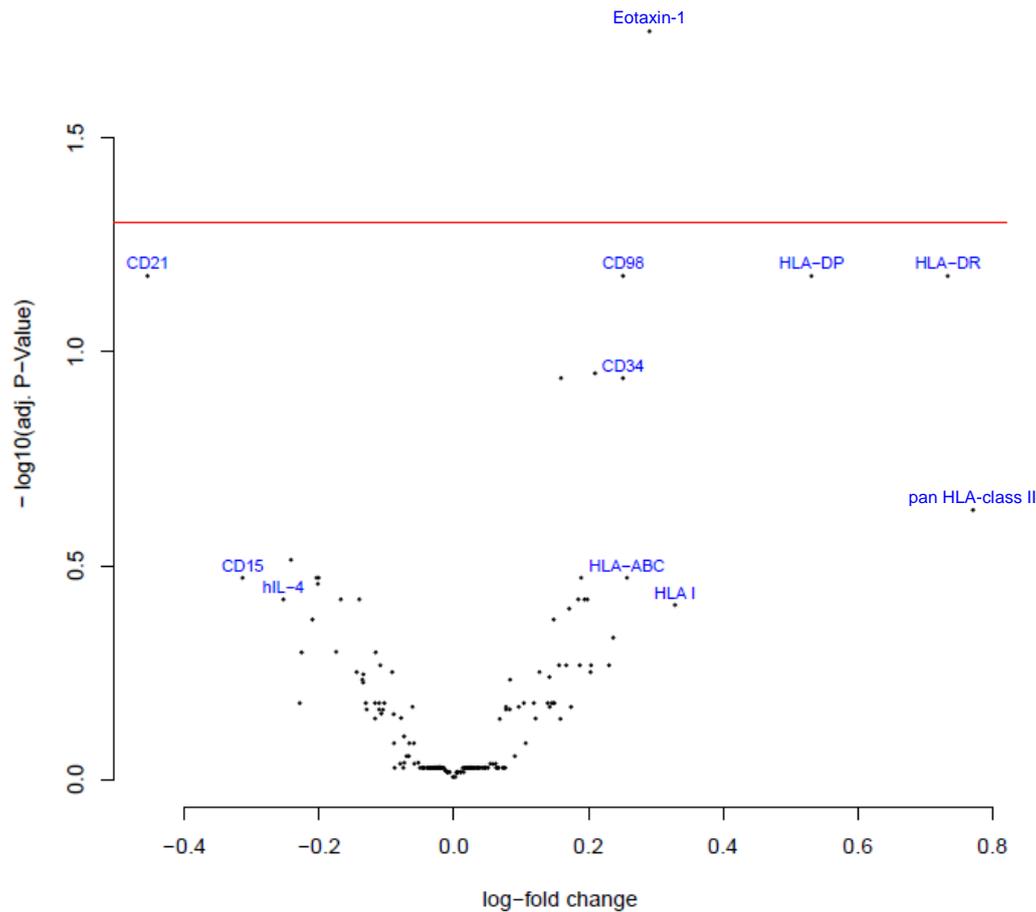


Abbildung 29 (Sciomics): Differentielle Proteinexpression zw. den Ansätzen BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3 (Kontrolle). Der Vergleich des Proteinprofils von NK3.3 im Epirubicin + Trastuzumab-therapierten Ansatz mit dem von NK3.3 im nicht-therapierten Ansatz identifiziert ein statistisch signifikant hochreguliertes Protein: Eotaxin-1. Denn gegenüber der Kontrollgruppe herunterregulierte Proteine kommen links, hochregulierte Proteine rechts des x-Wertes 0 zum Liegen, während die rote, horizontale Gerade das statistische Signifikanzniveau der differentiellen Expression anzeigt.

BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab

Protein	Antikörper	logFC	adj. p-value
IL-1 beta	si_159	0.31	3.9e-03
CD15	si_044	-0.55	2.3e-03
CD21	si_059	-0.69	2.3e-03

Tabelle 28 (Sciomics): Zwischen BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab (Kontrolle) statistisch signifikant differentiell exprimierte Proteine. Je positiver der logFC-Wert eines Proteins, desto mehr ist es gegenüber der Kontrolle hochreguliert – und umgekehrt je negativer, desto mehr ist es gegenüber der Kontrolle herunterreguliert (hier: ein gegenüber der Kontrolle signifikant höher exprimiertes und zwei signifikant niedriger exprimierte Proteine). Die p-Werte wurden für multiples Testen korrigiert.

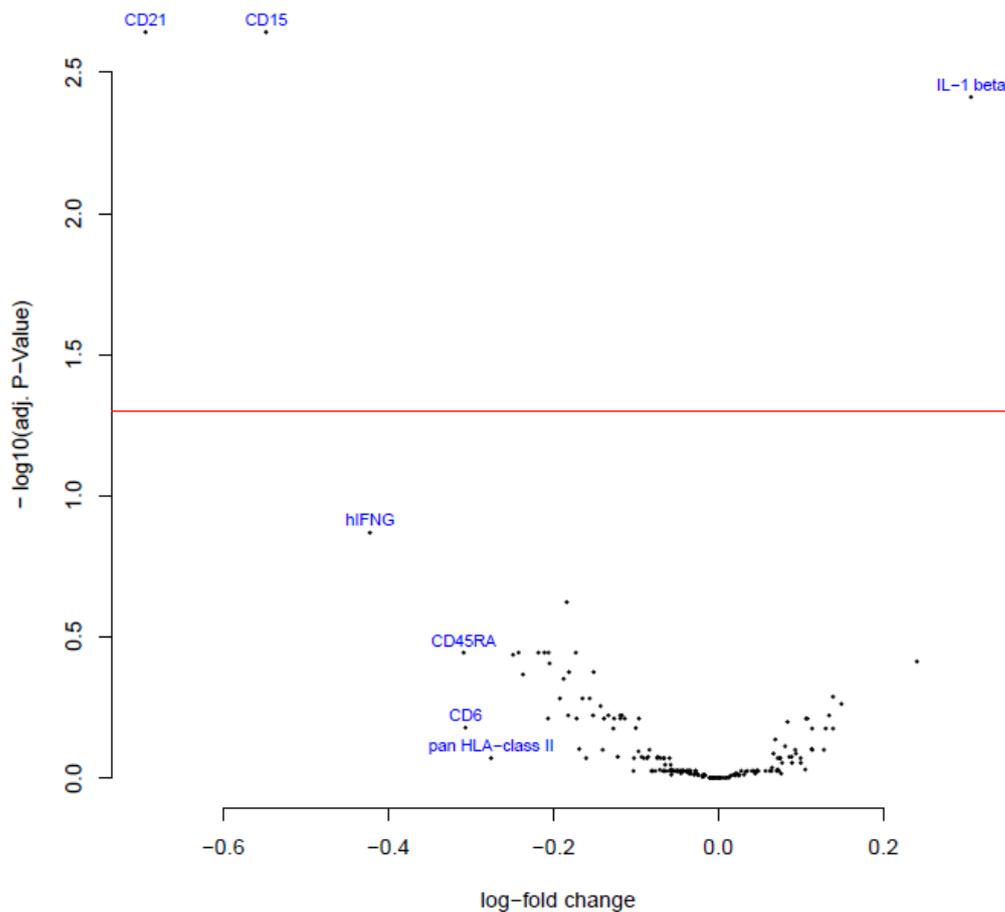


Abbildung 30 (Sciomics): Differentielle Proteinexpression zw. den Ansätzen BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab (Kontrolle). Der Vergleich des Proteinprofils von NK3.3 im Epirubicin + Trastuzumab-therapierten Ansatz mit dem von NK3.3 im Trastuzumab-therapierten Ansatz identifiziert zwei statistisch signifikant hochregulierte Proteine, CD15 und CD21, und ein statistisch signifikant herunterreguliertes Protein, IL-1 beta. Denn gegenüber der Kontrollgruppe herunterregulierte Proteine kommen links, hochregulierte Proteine rechts des x-Wertes 0 zum Liegen, während die rote, horizontale Gerade das statistische Signifikanzniveau der differentiellen Expression anzeigt.

4.3. Kokultur-Versuche mit CBMC als Effektorzellen

Neben den NK3.3 wurden aber auch CBMC von 6 Nabelschnurblut (NBS)-Spenderinnen als Effektorzellen eingesetzt, die 5:1 mit BT-474 kokultiviert und über 24 h/48 h behandelt wurden. Zeitgleich zur Kokultivierung, zum 0-h-Zeitpunkt der Versuchsreihen, wurde ein Teil der CBMC durchflusszytometrisch voruntersucht, um deren Verteilung insb. über die einzelnen Lymphozytenreihen anhand charakteristischer Scatter-Signale und der differentiellen Expression Zellspezies-spezifischer Antigene offen zu legen: Zellen der myeloiden Reihe (CD33⁺), B-Lymphozyten (CD19⁺), T-Lymphozyten (CD3⁺) und NK-Zellen (NKp46⁺) konnten in dieser durchflusszytometrischen Messung differenziert werden. Die NK-Zell-, „Wolke“ (anti-NKp46-APC), v. a. im Hinblick auf ADCC-Effekte von besonderem Interesse, wurde Isotyp-kontrolliert (anti-IgG1κ-APC) diskriminiert und die Versuchsreihen entsprechend der Größe des NK-Zell-Subsets zwei gesonderten Gruppen zugeteilt, wobei ein Cut-Off-Wert von 5 % festgesetzt wurde:

- **Gruppe 1 (MNC 1):** Unter der Gruppe mit < 5 % NK-Zellen subsumierten sich drei Experimentreihen (n = 3). Die NK-Zellen stellen hier im Mittel nur 0,7 % der MNC-Zellen (0,3-1,5 % NK-Zellen).
- **Gruppe 2 (MNC 2):** Unter dem Einschlusskriterium ≥ 5 % wurden ebenso drei Versuchsreihen (n = 3) durchgeführt, deren prozentualer NK-Zell-Anteil gemittelt bei 17,5 % lag, d. h. 25-fach höher (6,9-24,6 % NK-Zellen).

4.3.1. Typisierung der CBMC

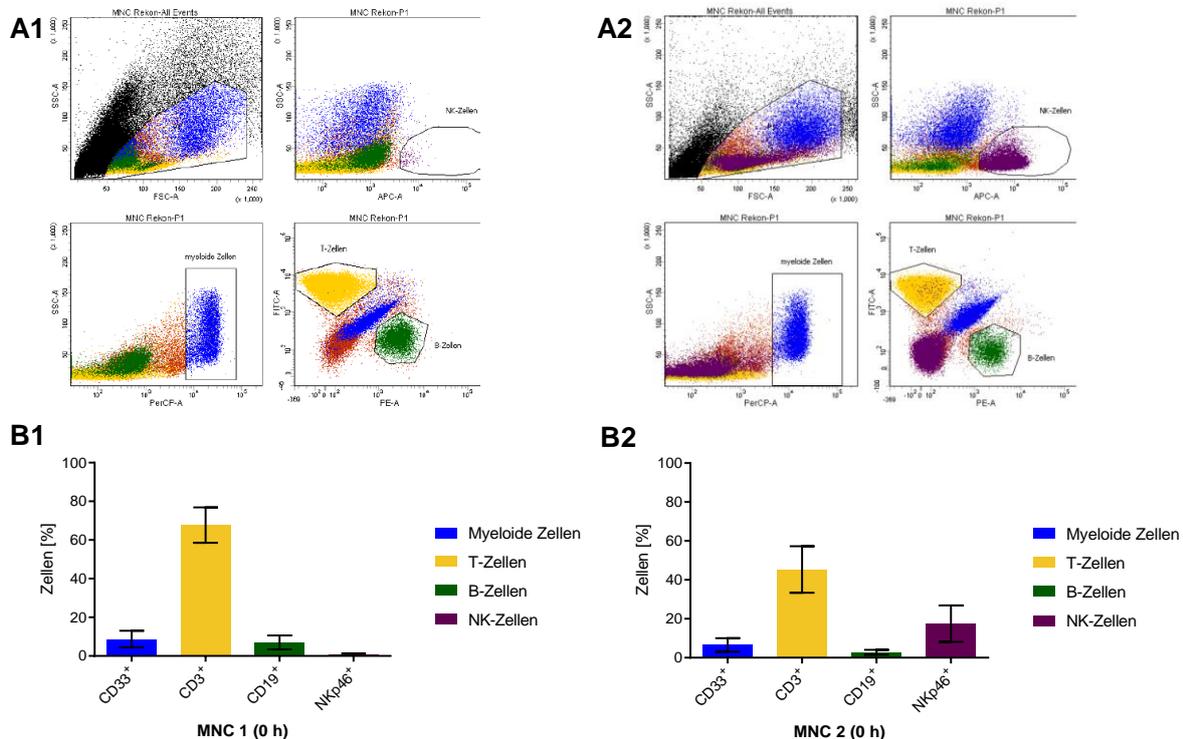


Abbildung 31: Typisierung der CBMC anhand charakteristischer Scatter-Signale und der Expression von CD33, CD3, CD19 und NKp46. MNC 1 (mit < 5 % NK-Zellen) und MNC 2 (mit ≥ 5 % NK-Zellen) sind vergleichend gegenübergestellt. (A) Darstellung der Gating-Strategie zur Diskriminierung der Subpopulationen, exemplarisch für MNC 1 (A1) und MNC 2 (A2). (B) Darstellung der Verteilung der MNC 1 (B1) und MNC 2 (B2) auf die Subpopulationen.

MNC 1 (< 5 %)	Mittelwert	± SD	MNC 2 (≥ 5 %)	Mittelwert	± SD
– CD33 ⁺	8,7 %	± 4,3 %	– CD33 ⁺	6,5 %	± 3,5 %
– CD3 ⁺	67,7 %	± 9,2 %	– CD3 ⁺	45,3 %	± 12,0 %
– CD19 ⁺	7,0 %	± 3,7 %	– CD19 ⁺	2,8 %	± 1,6 %
– NKp46 ⁺	0,7 %	± 0,7 %	– NKp46 ⁺	17,5 %	± 9,4 %

Tabelle 29: Ergebnisse der Typisierung der CBMC der Gruppe 1 (MNC 1 mit < 5 % NK-Zellen) und der Gruppe 2 (MNC 2 mit ≥ 5 % NK-Zellen).

Die Ergebnisse hinsichtlich der Verteilung der CBMC-Zellen sind in Abbildung 31 für Gruppe 1 (MNC 1) und 2 (MNC 2) vergleichend gegenübergestellt, vorangestellt ist die Gating-Strategie. Der NK-Zell-Anteil (NKp46⁺) ist in Gruppe 2 statistisch signifikant gegenüber Gruppe 1 erhöht (p = 0,0293). In Gruppe 1 finden sich hingegen deutlich mehr T- (CD3⁺) Zellen (p = 0,0034). Für B- (CD19⁺) und myeloide (CD33⁺) Zellen können hingegen keine relevanten Varianzen zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden (vgl. Tab. 29 und Abb. 32)

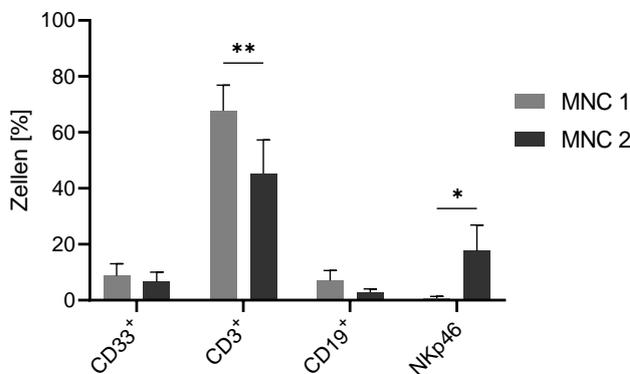


Abbildung 32: Vergleich der CBMC der Gruppe 1 (MNC 1 mit < 5 % NK-Zellen) und 2 (MNC 2 ≥ 5 % NK-Zellen) hinsichtlich ihrer Verteilung auf die Subpopulationen. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen.

4.3.2. Phänotypisierung der cord blood-derived NK-Zellen

Ein zweiter aliquoter Teil diente der näheren Phänotypisierung des über NKp46 aufgespurten NK-Zell-Subsets. Die NKp46⁺ gatede Population wurde wiederum unter Verwendung von vier Fluoreszenzgekoppelten AK auf ihre CD56-, CD16-, CD27- und CD137-Expression hin gescreent (analog der Phänotypisierung der NK3.3 in Kap. 4.2.4.). Die NK-Phänotypisierung schloss sich direkt an die Differenzierungsmessung an (Zeitpunkt 0 h). Die Ergebnisse sind im Folgenden wiederum durch Gegenüberstellung beider Gruppen demonstriert (vgl. Abb. 33).

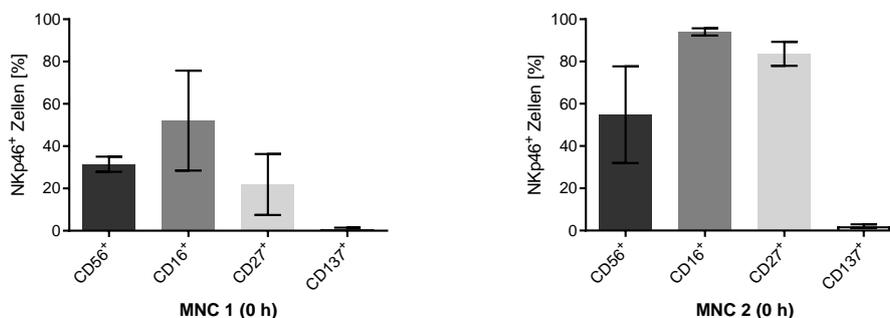


Abbildung 33: Phänotypisierung der cord blood-derived NK-Zellen anhand der Expression von CD56, CD16, CD27, CD137. MNC 1 (mit < 5 % NK-Zellen) und MNC 2 (mit ≥ 5 % NK-Zellen) sind vergleichend gegenübergestellt.

MNC 1 (< 5 %)	Mittelwert	± SD	MNC 2 (≥ 5 %)	Mittelwert	± SD
– CD56 ⁺	31,4 %	± 3,6 %	– CD56 ⁺	54,8 %	± 22,9 %
– CD16 ⁺	52,1 %	± 23,6 %	– CD16 ⁺	94,0 %	± 1,7 %
– CD27 ⁺	21,9 %	± 14,4 %	– CD27 ⁺	83,6 %	± 5,7 %
– CD137 ⁺	0,7 %	± 0,8 %	– CD137 ⁺	2,1 %	± 0,9 %

Tabelle 30: Ergebnisse der Phänotypisierung der cord blood-derived NK-Zellen der Gruppe 1 (MNC 1 mit < 5 % NK-Zellen) und der Gruppe 2 (MNC 2 mit ≥ 5 % NK-Zellen).

Die NK-Zellen der sechs NSB-Spenderinnen zeigten hierbei deutliche interindividuelle Unterschiede im Expressionsprofil der analysierten Antigene (vgl. Tab. 30 und Abb. 34). Lediglich die CD137-Expression bewegte sich für beide Gruppen nahe dem Nullniveau. CD56 exprimierten in Gruppe 1 weithin einheitlich $31,4 \pm 3,6$ % der Zellen. In Gruppe 2 zeigte sich demgegenüber eine erhöhte Expression von $54,8 \pm 22,9$ % CD56⁺ Zellen ($p = 0,0360$). Die Expression von CD16 belief sich in Gruppe 1 gemittelt auf stark schwankende $52,1 \pm 23,6$ % gegenüber einer mit $94,0 \pm 1,7$ % statistisch signifikant erhöhten Expression von CD16 in Gruppe 2 ($p = 0,0002$). CD27 betreffend ließen sich in Gruppe 1 nur $21,9 \pm 14,4$ % positive Zellen identifizieren, wohingegen sich in Gruppe 2 ein knapp vierfacher CD27⁺ Anteil fand, der mit $83,6 \pm 5,7$ % statistisch signifikant höher liegt ($p = 0,0001$).

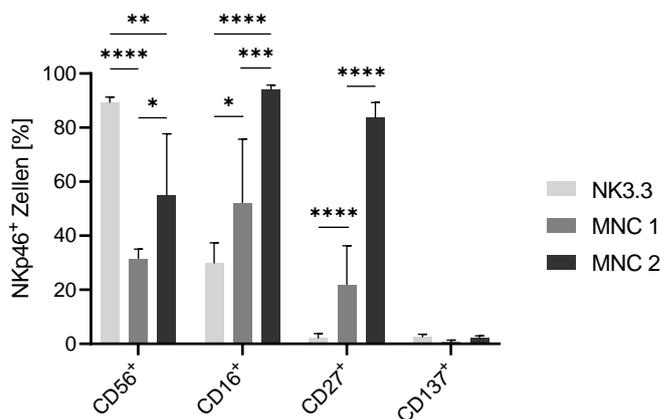


Abbildung 34: Vergleich der Expressionsprofile der NK-Zellen der Gruppe 1 (MNC 1 mit < 5 % NK-Zellen) und 2 (MNC 2 ≥ 5 % NK-Zellen) mit NK3.3. Die eingezeichneten Geraden beschreiben statistische Signifikanzen.

4.3.3. Direkte und indirekte Killing-Aktivität der CBMC

Auf die Charakterisierung und die (NK-Zell-Anteil-abhängige) Einteilung der CBMC in die Gruppen 1 und 2 folgte analog zu den NK3.3-Kokulturrexperimenten die durchflusszytometrische Zelltod-Messung in Abhängigkeit der sechs Bedingungen (vgl. Abb. 35).

Gruppe 1 (MNC 1, < 5 % NK-Zellen)

Zum 24-h-Zeitpunkt liegt der Anteil apoptotischer Zellen in der unstimulierten Kokultur bei $42,7 \pm 9,2$ %. Eine Exposition gegenüber Epirubicin bzw. Paclitaxel bewirkt keine Änderung der Apoptose-Fraktion ($46,4 \pm 5,5$ %) und auch additives Paclitaxel induziert keine nennenswerte Erhöhung ($49,9 \pm 4,2$ %). Auch die Trastuzumab-therapierte Kokultur weist mit $50,1 \pm 6,1$ % keinen nennenswert erhöhten Anteil an apoptotischen Zellen auf, der sich ebenso durch kombiniertes Epirubicin ($51,7 \pm 7,4$ %) wie auch Paclitaxel ($54,3 \pm 18,7$ %) nur unmerklich steigert.

Nach 48 h Inkubation beläuft sich die apoptotische Fraktion in der reinen Kokultur auf $33,8 \pm 5,5$ %. Sie steigt durch Hinzufügen von Epirubicin geringfügig auf $45,8 \pm 14,5$ % bzw. Paclitaxel auf $49,0 \pm 3,7$ % und bewegt sich unter Trastuzumab-Therapie auf ähnlichem Niveau: $47,1 \pm 9,0$ %. Durch zusätzliches Epirubicin zeigt sich demgegenüber kein wesentlicher Unterschied, die Frequenz sterbender Zellen nivelliert weitgehend unbeeinflusst um $45,0 \pm 4,9$ %. Die kombinierte AK-Paclitaxel-Behandlung lässt den apoptotischen Anteil dagegen (nicht signifikant) auf $54,6 \pm 12,1$ % anwachsen.

Gruppe 2 (MNC 2, ≥ 5 % NK-Zellen)

Nach dem 24-h-Intervall befinden sich in der unstimulierten Kokultur $32,4 \pm 19,4$ % der Her2⁺ Zellen in Apoptose. In der Epirubicin-stimulierten Kokultur liegt die Frequenz zugrunde gehender Her2⁺ Zellen bei $37,6 \pm 21,0$ %, bei einer Paclitaxel-Behandlung erhöht sie sich auf $43,9 \pm 11,1$ %. Eine additive Trastuzumab-Therapie induziert überdies eine Steigerung des unstimulierten Wertes auf $60,6 \pm 5,3$ %. Wird die Trastuzumab-Therapie ferner mit Epirubicin kombiniert, zeigt sich kein erheblicher Effekt im Hinblick auf die Apoptoserate, sie liegt etwa gleichbleibend bei $61,5 \pm 4,8$ %. AK plus Paclitaxel heben den Apoptose-Anteil dagegen auf $68,0 \pm 4,8$ % an, was statistisch aber keine Signifikanz erlangt.

Über 48 h inkubiert beträgt die Apoptoserate in der nicht-stimulierten Kokultur $33,4 \pm 15,6$ % und nimmt unter Epirubicin auf $42,8 \pm 13,0$ %, bzw. unter Paclitaxel auf $54,1 \pm 18,89$ % zu. Die AK-Therapie kann das Ausmaß der Apoptose auf $67,0 \pm 19,97$ % steigern. Kombiniert mit Epirubicin induziert Herceptin eine weitere Steigerung des Tumorzellsterbens auf $72,5 \pm 16,16$ %, scheint jedoch in Verbindung mit Paclitaxel noch effizienter, worunter sich die Frequenz sterbender bzw. toter Tumorzellen auf $81,2 \pm 12,4$ % erhöht, was einer statistisch signifikanten Steigerung gegenüber der nicht-stimulierten Kokultur entspricht ($p = 0,0367$).

Die Versuche mit den CBMC unterstreichen, dass NK-Zellen die Hauptakteure der ADCC zu sein scheinen, da nur in Gruppe 2 mit relevanter NK-Zell-Fraktion ein ADCC-Effekt beobachtet werden kann. Darüber hinaus lässt sich auch nur in den Kokulturen der Gruppe 2 ein positiver Effekt von Epirubicin und Paclitaxel auf die ADCC erahnen, was zu der Vermutung verleitet, NK-Zellen könnten auch hierin verwickelt sein. Allerdings erreichen all diese (Zelltodinduktions-)Vergleiche zw. Gruppe 1 und Gruppe 2 – vermutlich auch wegen der hohen Variabilität innerhalb beider Gruppen – keine statistische Signifikanz (vgl. Abb. 36).

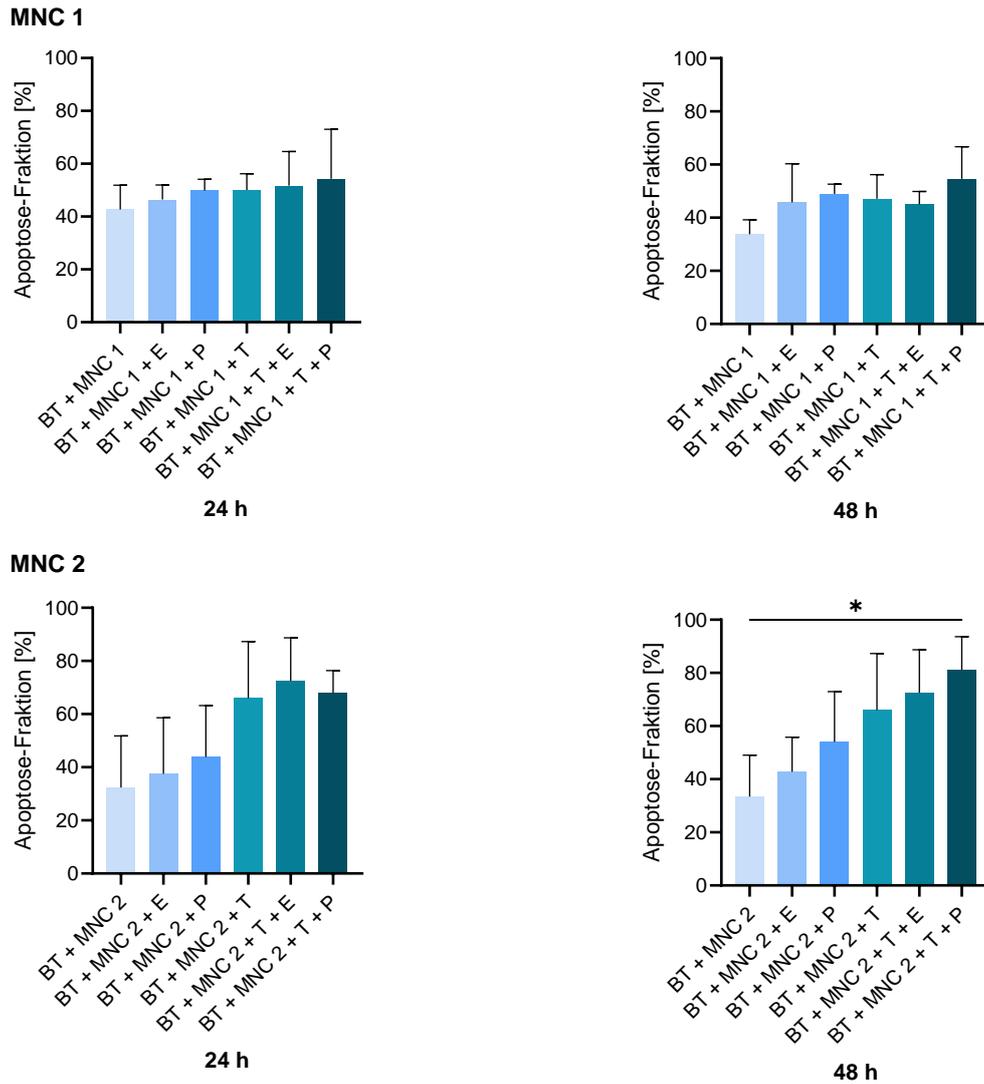


Abbildung 35: Apoptoseinduktion (Annexin V/FITC-Assay) in BT-474 in Abhängigkeit der sechs Bedingungen nach 24 h und 48 h für Gruppe 1 (MNC 1 mit < 5 % NK-Zellen, oben) und Gruppe 2 (MNC 2 mit ≥ 5 % NK-Zellen, unten). Fehlerbalken geben die Standardabweichungen (= SD) aus drei unabhängigen Experimente wieder. Die eingezeichnete Gerade beschreibt eine statistische Signifikanz.

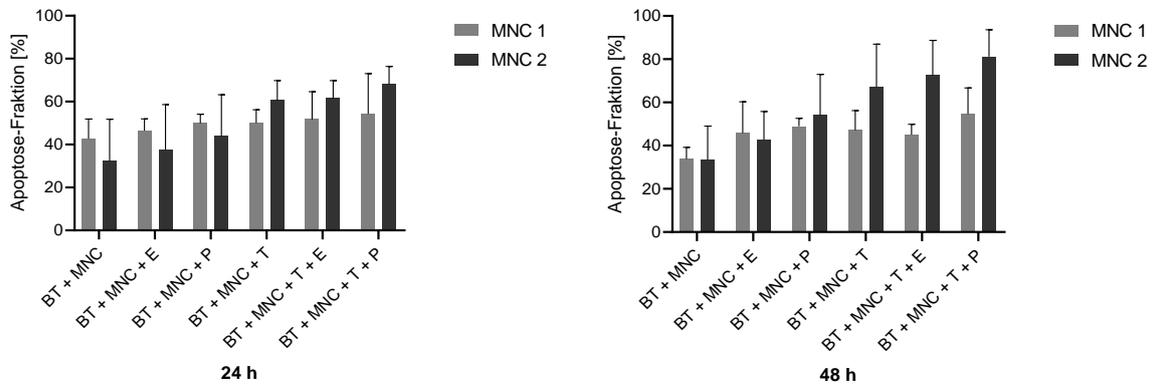


Abbildung 36: Vergleich der Apoptoseinduktion in der MNC 1-Kokultur mit der in der MNC 2-Kokultur nach 24 h und 48 h. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen (= SD) aus den jeweils drei unabhängigen Experimenten an.

5. Diskussion

5.1. Einfluss der Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität

Ziel der Arbeit war es, 1.) aufzudecken, welchen Einfluss eine Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die direkte v. a. aber auf die indirekte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität der NK-Zellen üben würde, um 2.) nach zugrundeliegenden Änderungen auf (Effektor-)Zellebene zu fahnden, weswegen die differentielle Expression einer Reihe von CD-Antigenen, aber auch anderer relevanter Proteine in Abhängigkeit der Antikörper- ± Anthracyclin- bzw. Taxan-Therapie analysiert wurde.

Die Bedingungen wurden hierfür in Kokultur-Experimenten mit unterschiedlichen Her2⁺ Tumorzelllinien untersucht und letztendlich das Her2⁺, Herceptin-sensible Tumormodell mit BT-474 + NK-Zellen der Linie NK3.3 (1:1) für die anschließenden Untersuchungen ausgewählt. Deswegen wird dieses Kokultur-Modell hier einleitend diskutiert.

5.1.1. Her2⁺, Herceptin-sensibles Kokultur-Modell

Obwohl BT-474 Her2⁺, Herceptin-sensible Zellen sind, triggerte Herceptin (2 µg/ml) nicht deren Zelltod. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Arbeiten der AG, die darlegen, die *targeted therapy* alleine induziere in BT-474 in vitro – auch in höherer Konzentration (10 µg/ml) – kaum programmierten Zelltod, bremse BT-474 aber in ihrem Zellzyklus: Ein deutlich größerer Teil trete von der G₁- in die Ruhe- (G₀-Phase-Fraktion: 38,4 % vs. 1,8 %), dagegen ein deutlich geringerer in die Replikationsphase (S-Phase-Fraktion: 8,1 % vs. 26,1 %) ein¹⁴³. Der G₁-Arrest (bzw. G₀-Entry) ist Korrelat der Herceptin-vermittelten Hemmung der pro-proliferativen Her2-Hauptsignalkaskaden, dem Ras/Raf/MEK/ERK- und dem PI3K/Akt/mTOR-Pathway, als auch einer Komponente des Zellzyklus-Kontrollsystems, dem Cyclin E/CDK2-Komplexes, der in die G₁-S-Progression involviert ist und deren Inhibitor p27 Herceptin induziert⁶⁵.

In vivo löst Trastuzumab dagegen anders als in vitro durchaus Apoptose aus¹⁴⁴, was zu der Hypothese verleitet, die Induktion von PCD könnte weniger auf direkten als auf indirekten, immunvermittelten Effekten beruhen, die eben erst in vivo oder in komplexeren in-vitro-Versuchsaufbauten (wie den nachfolgenden) zu Tage treten.

Wie zu erwarten, wurde auch bei den Epirubicin- und Paclitaxel-therapierten BT-474 (ohne Kokultur mit NK-Zellen) nicht nennenswert mehr PCD beobachtet, denn die Anthracyclin- wie auch die Taxan-Konzentration waren i. R. der Vorversuchsreihen gezielt so festgesetzt worden: Sie sollten die Tumorzellen in ihrer Zellteilung kompromittieren, jedoch (noch) nicht in den Zelltod treiben, da nicht deren gesicherte, direkte Effekte auf die Tumorzellen, sondern deren noch nicht gesicherte, indirekte Effekte auf die NK-Zellen bzw. die NK-Zell-Funktionen, allen voran auf die ADCC, analysiert werden sollten. Folglich verifizierten diese Versuche die im Vorfeld titrierten Dosierungen. Die initialen Konzentrationen, orientiert an den Angaben in der Literatur (u. a. Pegram et al.¹⁴⁵), waren vor dem dargelegten Hintergrund zu hoch, weswegen mit 0,02 µg/ml für Epirubicin und mit 0,005 µg/ml für Paclitaxel erst nach langer Titration Endkonzentrationen definiert waren.

Wider Erwarten gingen aber auch unter kombinierter Therapie – Herceptin + Epirubicin bzw. Paclitaxel (ohne Kokultur mit NK-Zellen) – nicht nennenswert mehr BT-474 in PCD, obgleich die Literatur – u. a. auch konkret für die Interaktion von Herceptin plus Epirubicin wie Herceptin plus Paclitaxel in vitro an BT-474 – einen additiven Effekt nahelegt^{145,146}. Eine Reihe klinischer Studien, die folgten, verifizierten den Benefit der kombinierten Therapieregime. Den Einzug in die Klinik ebnete schließlich die Schlüsselstudie von Slamon et al. aus 2001, die der Addition der zielgerichteten Anti-Her2-Antikörpertherapie zur Anthracyclin- bzw. Taxan-haltigen konventionellen Chemotherapie an einem Kollektiv von über 400 Her2⁺ BC-Patient*innen Überlegenheit attribuierte⁷⁵. Doch trotz ihrer Implementierung in die Leitlinie des Her2⁺ BC ist nicht belegt, *wie* sie sich in ihrer Wirkung an der Her2⁺ Tumorzelle potenzieren. Postuliert wurde z. B., Herceptin Chemosensibilisiere Her2⁺ Zellen, indem es die DNA-Repair beeinträchtigt^{147,1}. Dass der erwartete additive Effekt hier nicht zu Tage tritt, könnte erneut an der vergleichsweise niedrigen Anthracyclin-/Taxan-Konzentration liegen. Denn der von Baselga et al. beschriebene additive Effekt (für Herceptin plus Paclitaxel) war konzentrationsabhängig¹⁴⁶.

Um direkte bzw. indirekte, antikörperabhängige NK-Zell-Zytotoxizität nachvollziehen zu können, wurden BT-474 in einer 1:1 Ratio mit NK-Zellen der Linie NK3.3 kokultiviert. Durch die Kokultivierung wurde direktes Killing induziert: Nach zweitägiger Zellinteraktion nahm der prozentuale Gehalt untergehender BT-474 deutlich, nach dreitägiger signifikant zu. Und durch zugegebenes Herceptin gingen zu beiden Zeitpunkten – wie erwartet – antikörperabhängig am meisten Her2⁺ Zielzellen zugrunde (ADCC-Effekt).

Aber die eigentliche Kernfrage, die die Arbeit angetrieben hatte, war, *wie* die Anthracyclin- oder Taxan-Therapie diese direkte antikörperunabhängige (CC), v. a. aber die indirekte antikörperabhängige zelluläre Zyotoxizität (ADCC) der NK-Zellen beeinflussen würde. Denn trotz des gesicherten, generellen Benefits einer kombinierten Anthracyclin-/Taxan- + Anti-Her-2-Antikörpertherapie bei Her2⁺ BC-Patient*innen (in vivo), ist deren dezidiertes Effekt auf die CC und v. a. aber auf die ADCC (in vitro wie in vivo) noch nicht hinreichend aufgearbeitet. Die z. T. widerstreitende Datenlage zur CC unter Anthracyclinen/Taxanen – z. B. je zwei zitierte Arbeiten für und wider einer Potenzierung durch Paclitaxel – überblickt die folgende Tabelle, zur ADCC unter Anthracyclinen/Taxanen liegen dagegen kaum Daten vor.

	Effektor (E)- und Targetzellen (T)	Effekt auf die direkte NK-Zell-Zytotoxizität	Referenz
Anthracycline			
– Daunorubicin	– E: murine NK-Zellen (Milz; C57BL/6J) – T: murine YAC-1 – E:T: 10:1; 20:1; 50:1 (16-18 h)	(↓) (⁵¹ Cr release assay)	Mantovani et al. ¹⁵¹
– Doxorubicin	– E: murine NK-Zellen (Milz; C57BL/6J) – T: murine YAC-1 – E:T: 10:1; 20:1; 50:1 (16-18 h)	↔ (⁵¹ Cr release assay)	Mantovani et al. ¹⁵¹

¹ Immerhin für die Paclitaxel-Interaktion existiert konkretere Evidenz: Herceptin begünstigt Paclitaxel durch effektivere Aktivierung des für den Paclitaxel-induzierten PCD relevanten p34^{Cdc2}, durch Herunterregulierung anti-apoptischen (in Her2⁺ Zellen, hochregulierten) Mcl-1 und durch synergistische Inhibition des IGF-Signaling¹⁴⁸⁻¹⁵⁰.

Doxorubicin/ Epirubicin	<ul style="list-style-type: none"> – E: NK-Zellen (PBMCs von Proband*innen) und NK-Zelllinien (Nishi, NKL, NK92, KHYG-1) – T: K562 – E:T: 5:1 (5 h) 	(↓)/↔ (fluorescent labeled killing assay)	Markasz et al. ¹⁵²
Taxane			
– Taxan-basierte Chemotherapie (Docetaxel/ Paclitaxel)	<ul style="list-style-type: none"> – E: PBMCs Taxan-therapierter BC-Patient*innen <u>vs.</u> nicht Taxan-therapierter BC-Patient*innen – T: K562 – E:T: 100:1; 50:1; 25:1; 12,5:1; 6,25:1; 3,13:1 (5 h) 	↑ (⁵¹ Cr release assay)	Carson et al. ¹⁵³
– Docetaxel/ Paclitaxel	<ul style="list-style-type: none"> – E: PBMCs von Proband*innen <u>vs.</u> BC-Patient*innen vor <u>vs.</u> nach Taxan-Therapie – T: K562 – E:T: 40:1 (18 h) 	<u>vor</u> Taxan-Therapie: ↓ (vgl. mit Proband*innen) <u>nach</u> Taxan-Therapie: ↑ (vgl. mit BC-Patient*innen vor Taxan-Therapie) (⁵¹ Cr release assay)	Tsavaris et al. ⁹⁹
– Docetaxel/ Paclitaxel	<ul style="list-style-type: none"> – E: NK-Zellen (PBMCs von Proband*innen) und NK-Zelllinien (Nishi, NKL, NK92, KHYG-1) – T: K562 – E:T: 5:1 (5 h) 	↓ (fluorescent labeled killing assay)	Markasz et al. ¹⁵²
– Paclitaxel	<ul style="list-style-type: none"> – E: PBMCs von NSCLC-Patient*innen vor <u>vs.</u> nach Paclitaxel-Therapie – T: K562 – E:T: 40:1; 20:1; 10:1 (3,5 h) 	↓ <u>aber:</u> sehr schnelles „recovery“ der NK-Zell-Zytotoxizität (⁵¹ Cr release assay)	Sako et al. ¹⁵⁴
– Paclitaxel	<ul style="list-style-type: none"> – E: NK-Zellen (PBMCs von Proband*innen) – T: K562, BT-474 – E:T: 10:1; 5:1 (4 h) 	↑ (⁵¹ Cr release assay)	Kubo et al. ¹⁵⁵
Anthracycline + Taxane			
– Anthracyclin- und Taxan-basierte Chemotherapie (Doxorubicin + Paclitaxel)	<ul style="list-style-type: none"> – E: PBMCs von Proband*innen <u>vs.</u> BC-Patient*innen vor <u>vs.</u> nach Chemotherapie – T: K562 – E:T: 10:1 (4 h) 	<u>vor</u> Chemotherapie: ↓ (vgl. mit Proband*innen) <u>nach</u> Chemotherapie: ↔ (vgl. mit BC-Patient*innen vor Chemotherapie)	Verma et al. ¹⁵⁶

Tabelle 31: Effekt einer Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die direkte Killing-Aktivität der NK-Zellen. ↑/(↑) = unter Anthracyclin-/Taxan-Therapie erhöhte/grenzwertig erhöhte direkte NK-Zell-Zytotoxizität, ↓/(↓) = unter Anthracyclin-/Taxan-Therapie erniedrigte/grenzwertig erniedrigte direkte NK-Zell-Zytotoxizität, ↔ = unter Anthracyclin-/Taxan-Therapie unveränderte direkte NK-Zell-Zytotoxizität. Kritisch zur Kenntnis genommen werden sollten, die verglichen mit den hier durchgeführten Experimenten hohen E:T Beziehungen, die kurzen Kokultivierungszeiten und die Verwendung weniger sensitiver Zellyseassays als Readout.

Anhand der Literatur konnte daher nicht extrapoliert werden, welchen Einfluss die Addition des Anthracyclins/Taxans (in diesem experimentellen Setting) auf die direkte und noch weniger, welchen auf die indirekte, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität der NK-Zellen üben würde, v. a. auch vor dem Hintergrund der „immunologischen“ Neubewertung konventioneller Chemotherapeutika (vgl. Kap. 1.7.). Denn wenigstens einige Wirkstoffgruppen zeigen nicht nur immunsuppressive, sondern mindestens immunmodulierende und z. T. sogar -stimulierende Effekte im Tumor(-mikromilieu). Ähnlich auch in dieser Arbeit: Zum 72-h-Zeitpunkt deutete sich nämlich in der Antikörper-behandelten wie in der unbehandelten Kokultur für Epirubicin und geringer auch für Paclitaxel ein Benefit an. Jedoch erreichte dieser Effekt nur für Epirubicin – BT + NK + T vs. BT + NK + T + E – statistische Signifikanz ($p = 0,0192$).

5.1.2. Variation der Effektor:Target Ratio

Um potentere Kokulturmodelle zu generieren, werden oft wesentlich höhere Effektor-zu-Zielzell-Beziehungen festgesetzt. Bis zu 100 Immunzellen pro Tumorzelle werden laut Literatur kurzzeitig koinkubiert¹²² – eine Immunzellendichte, die im Tumormikromilieu illusorisch erscheint. Doch der Vorzug dieser intensivierten Kurzzeitkulturen scheint in der Minimierung direkter zytotoxischer NK-Zell-Effekte zu liegen (MHC mismatch-Effekte). Zu frühen Zeitpunkten tendieren die direkten Effekte nämlich hinter den indirekten, Herceptin-vermittelten Effekten zurückzubleiben, weswegen – wenn letztere visiert werden – oft höhere E:T Quotienten, jedoch kürzere Kokultivierungszeitfenster festgesetzt werden^{157–159}.

Neben der 1:1-NK-zu-Tumorzell-Ratio (24 h/48 h/72 h) wurde daher auch hier eine 5:1 Ratio (4 h/24 h) getestet. Und in der Tat, zum frühen Zeitpunkt – nach 4 h – gingen in der Antikörper-therapierten 5:1 Kokultur (BT + NK + T) verglichen mit der nicht therapierten 5:1 Kokultur (BT + NK) doppelt so viele Tumorzellen zugrunde, d. h. die NK-Zellen attackierten ihre Her2⁺ Targetzellen Anti-Her2-antikörperabhängig (indirekt), aber noch nicht antikörperunabhängig (direkt). Bemerkenswert auch: Zum 4-h-Zeitpunkt dämpfte die Addition des Anthracyclins/Taxans die ADCC eher. Nach 24 h hatte sich das geändert, es zeichneten sich ähnliche Effekte wie zum 72-h-Zeitpunkt in der 1:1 Kokultur ab.

Die Erhöhung der Effektorzellen pro Zielzelle – 5:1 vs. 1:1 – in vitro führte zwar wie auch in anderen Arbeiten zu einem eindrücklicheren, aber (vermeintlich) auch artifizielleren ADCC-Effekt. Zwar korreliert die Dichte Tumor-infiltrierender NK-Zellen auch in vivo mit einem besseren Outcome, erreicht aber, selbst wenn die „hohen“ NK-Zell-Dichten dieser Studien zugrunde gelegt werden, nicht annähernd die in-vitro-Relationen: Selbst dann belaufe sich das Verhältnis allenfalls auf 1:35 (E:T), schätzten Larsen et al¹⁶⁰. Auch die beiden Endpunkte – 4 und 24 h – sind unter dem Gesichtspunkt, Effekte von Epirubicin bzw. Paclitaxel detektieren zu wollen, vermeintlich verfrüht, da beide bei niedriger Konzentration über die Zeit wirken. Epirubicin agiert zwar anders als Paclitaxel eigentlich phasenunspezifisch (und daher über die Konzentration), wirkt aber bei (wie auch hier) niedrigen Konzentrationen phasenabhängig, am aktivsten auf Zellen der S-/G₂-Phase ein¹⁶¹.

5.1.3. Variation der Targetzellen

Neben dem Her2⁺, Herceptin-sensiblen wurde aber auch ein Her2⁺, Herceptin-resistentes sowie ein schwach Her2⁽⁺⁾, infolge ebenso intrinsisch resistentes Tumormodell untersucht.

Denn ein großer Teil der Her2⁺ BC-Patient*innen spricht schon *ab initio* nicht (hinreichend) auf Herceptin als single-agent an. Die erste Zelllinie, die von einem solchen Herceptin-resistenten, Her2⁺ Tumor hergeleitet werden konnte, ist JIMT-1.

Wie zu erwarten, wurde auch keine der beiden Vergleichszelllinien durch Herceptin ± Epirubicin bzw. ± Paclitaxel alleine relevant in ihrer Vitalität beeinträchtigt. Jedoch zeitigten die zugegebenen NK-Zellen im Vergleich deutlich differente Effekte. Im Herceptin-resistenten Her2⁺ Modell, JIMT-1, erwiesen sich NK3.3 als am potentesten. Schon nach 24 h (bei BT-474: nach 48 h) deutete sich direktes NK-Zell-Killing an, das nach 48 und 72 h eindeutig wurde (bei BT-474: geringer). Um einen Versuch zu unternehmen, die differente Zellinter- bzw. -reaktion der NK-Zelllinie in Abhängigkeit der Targetzelllinie zu erklären, hilft es, sich die Determinanten derer direkten Zytotoxizität vor Augen zu führen: Ihre Reaktivität hängt v. a. auch von der HLA-I-Expression ihrer Zielzellen – und dabei zum einen vom Expressionslevel (Autoreaktivität), zum anderen aber auch vom Expressionsprofil (Alloreaktivität) – ab. NK-Zellen entarnen entartete Zellen nämlich u. a. anhand herunterregulierter HLA-I-Proteine – eine Taktik, die alterierte Zellen entwickelt haben, um der Erkennung durch HLA-I-abhängige CD8⁺ T-Zellen zu entgehen. Die missing-self-Hypothese zugrunde legend, müsste JIMT-1 (da aggressiver attackiert) eine niedrigere MHC-I-Expression kennzeichnen. Doch die Recherche stützt diesen deduktiven Schluss nicht: Beide, BT-474 wie JIMT-1, charakterisiert ein ähnlich niedriger HLA-I-Gehalt¹⁶². Neben dem HLA-I-Expressionsniveau kommt aber auch dem -profil Bedeutung zu. V. a. in einem allogenen Setting, in dem die NK- und Zielzellen nicht HLA-ident sind, wirkt sich auch deren HLA-Match/-Mismatch aus¹⁶³. Denn die Lizenzierung der NK-Zellen eines Individuums – so die licensing-Hypothese – setzt mindestens einen MHC-I-spezifischen, inhibitorischen KIR-Rezeptor voraus (Toleranz). Sofern auch die Zellen eines anderen Individuums diesen KIR-Liganden, d. h. das entsprechende MHC-I-Protein, exprimieren, sind sie ebenso geschützt (*receptor-ligand model*). NK3.3 sind mit den inhibitorischen KIR2DL3 (CD158b2) und KIR2DL4 (CD158d) gerüstet¹⁶⁴. Deren Liganden sind das klassische HLA-Ia-Antigen C (KIR2DL3) und das nicht-klassische HLA-Ib-Antigen G (KIR2DL4)¹⁶⁵, wobei HLA-C von BT-474 (C*07:02/C*16:01) wie auch JIMT-1 (C*07:06/03:04) exprimiert wird¹⁶². Das nicht klassische HLA-G wird (anders als die konstitutiv exprimierten, klassischen HLA-A/B/C) unter physiologischen Bedingungen nur von wenigen immunprivilegierten Geweben hochreguliert, unter pathologischen aber auch von Tumoren inkl. derer der Brust, die sich dadurch einem NK-Zell-Angriff verwehren¹⁶⁶. Würden BT-474 HLA-G gegenüber JIMT-1 hochregulieren, könnte dies den energischeren NK-Zell-Angriff auf JIMT-1 erklären. Dies scheint jedoch nicht der Fall (BT-474: HLA-G^{neg})¹⁶⁶. Natürlich nehmen aber auch Nicht-HLA-Rezeptoren/-Liganden, wie NKG2D/NKG2D-L (aktivierend), Einfluss auf die Effektor-Target-Interaktion, auf die im Kapitel 5.2.1. näher eingegangen wird.

Die Zugabe des Anti-Her2-Antikörpers zur JIMT-1 zeigte dagegen (anders als bei BT-474) zu keinem der drei Zeitpunkte einen Effekt. Dies steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeiten meiner Gruppe, in denen Trastuzumab an JIMT-1 in vitro ebenso weder direkte (Fab-abhängige) noch indirekte (Fc-abhängige) Effekte entfaltete, aber im Widerspruch zu denen einer anderen Gruppe, bei denen die indirekten, immunvermittelten Effekte trotz der Resistenz in einem JIMT-1-Mausmodell noch griffen¹⁵⁸. Einen interessanten Trastuzumab-Resistenzmechanismus, der unsere Ergebnisse stützen würde, arbeiteten Nagy et

al. heraus. Diese Gruppe zeigte, dass die ErbB2-Expression zwar ähnlich der Herceptin-sensibler Zelllinien sei, die ErbB2-Bindungsstellen für Herceptin bei JIMT-1 jedoch (zu ca. 80 %) sterisch versperrt sind – und zwar durch Mucin 4¹⁶⁷, welches Tumorzellen zudem vor der Tötung durch Immunzellen zu schützen scheint¹⁶⁸. Auch die Addition von Epirubicin bzw. Paclitaxel änderte nichts am direkten oder indirekten NK-Zell-Killing, was Ausdruck einer Multidrug-Resistenz der JIMT-1-Linie sein könnte. Eine solche würde auch erklären, warum JIMT-1 nicht (wie BT-474) durch Epirubicin/Paclitaxel gegenüber dem direkten/indirekten NK-Zell-Killing vorsensibilisiert wird. Da JIMT-1 auf den Tumor einer Patientin zurückgeht, die u. a. unter Epirubicin-Therapie einen Progress erlitten hatte, liegt eine Anthracyclin-Resistenz nahe¹²⁰. Neben einem erhöhten Efflux der Chemotherapeutika scheint speziell in ihre Taxan-Resistenz ferner β 1-Integrin involviert, von dem sie hohe Level exprimieren^{169,170}.

Der Großteil der BC-Patient*innen wird aber aufgrund fehlender HER2-Genamplifikation bzw. Her2-Überexpression von vornherein für Herceptin-ungeeignet befunden. Modell eines solchen schwach Her2⁺, infolge intrinsisch Herceptin-resistenten Brusttumors bildet die Linie MDA-MB-453. Anders als JIMT-1 zeigte sie sich gegenüber NK3.3 besonders unempfindlich. Wurden die Kokulturen jedoch mit dem Taxan oder Anthracyclin behandelt, nahm der Anteil an zugrunde gehenden Tumorzellen, ergo ihre Empfindlichkeit gegenüber dem direkten NK-Zell-Killing, v. a. bei Paclitaxel-Behandlung, deutlich zu. Leider bleibt hier aber unbeantwortet, wie Paclitaxel (> Epirubicin) deren direktes Killing triggerte. Vielleicht könnte die niedrigere Her2-Expression der Zelllinie eine Rolle spielen, die in vitro mit einer höheren Empfindlichkeit gegenüber Taxanen in Verbindung gebracht wurde^{171,172}.

5.1.4. Variation der Effektorzellen

Für eine Reihe von Versuchen wurden ferner CBMCs als Effektorzellen verwendet, die durch die Aufreinigung und Aufarbeitung des Nabelschnurblutes (NSB) von sechs Probandinnen gewonnen wurden. Unter die CBMCs oder MNCs, per definitionem einkernige Zellen mit rundem Zellkern, fallen v. a. Mono- und Lymphozyten, unter letztere u. a. auch polyklonale NK-Zellen. Untersucht werden sollte, ob sich die mit NK3.3 erzielten Ergebnisse ebenso mit den (heterogenen) MNCs reproduzieren ließen.

Da anzunehmen war, die MNCs sechs distinkter NSB-Spenderinnen könnten sich in ihrer Komposition doch deutlich unterscheiden, wurden diese initial – zeitgleich zur Kokultivierung – phänotypisiert um 1.) eine Vorstellung von der Verteilung der Zellen über die einzelnen Lymphozyten-Populationen zu gewinnen und 2.) die quantifizierte NK-Zell-Population auch qualitativ zu analysieren. Und in der Tat zeigten sich v. a. für die NK-Zellen deutliche Differenzen: Der prozentuale NK-Zell-Anteil schwankte zw. 0,3 und 24,6 %. Bei drei der Spenderinnen lag die Frequenz der NK-Zellen dabei $\leq 1,5$ %, d. h. deutlich unter den Angaben der Literatur von 5-20 % für (*peripheral blood*) PB-NK-Zellen und bis zu 30 % für (*cord blood*) CB-NK-Zellen^{173,174}. Die niedrigeren NK-Zell-Frequenzen in den drei NSB-Spenden könnten auf probandenbezogene (z. B. Virusinfektion des Fetus), aber auch auf präanalytische oder analytische Faktoren (z. B. zeitliche Verzögerung der Probenaufreinigung/-aufarbeitung) zurückzuführen sein. Um überhaupt direkte und indirekte, antikörperabhängige NK-Zell-Zytotoxizität beobachten zu können, wurde daher ein Cut-Off von > 5 % NK-Zellen definiert, unter dem drei (von sechs) CBMCs eingeschlossen wurden. Zw. beiden Gruppen (Gruppe 1: < 5 %; Gruppe 2: ≥ 5 %) differierten die NK-Zellen statistisch signifikant. Einen

(großzügigen) durchschnittlichen CB-NK-Zell-Gehalt von 20 % zugrunde legend, wurde eine 5:1 E:T Beziehung festgesetzt (5:1 CBMC:BT-474 \approx 1:1 CB NK:BT-474).

Interessanterweise war das Baseline-Killing in Gruppe 1 gegenüber dem in Gruppe 2 gering erhöht, wofür vermeintlich der (statistisch signifikant) höhere Anteil an (zytotoxischen) T-Zellen in Gruppe 1 zu verantworten wäre. Wie bereits spekuliert, konnte in dieser Gruppe aber keine ADCC beobachtet werden. Auch zu den (un-)behandelten Kokulturen hinzugefügtes Epirubicin bzw. Paclitaxel erzeugte hier keinen Effekt. In Gruppe 2 zeichnete sich dagegen ein ADCC-Effekt ab, der insofern eindeutig den NK-Zellen zugeschrieben werden konnte. Anders als in Gruppe 1 wirkte sich hier auch die Addition des Anthracyclins/Taxans sowohl auf das direkte als auch auf das indirekte NK-Zell-Killing tendenziell positiv aus. Die Effekte tendierten in der ex-vivo-Kokultur wie bereits in der in-vitro-Kokultur über die Zeit zuzunehmen (24 h/48 h), erlangten aber keine statistische Signifikanz.

Die Gruppen unterschieden sich aber nicht nur im Hinblick auf ihre NK-Zellzahl, sondern auch hinsichtlich ihres NK-Zell-Phänotyps. In Gruppe 2 exprimierten $94,0 \pm 1,7$ % CD16, den Fc γ -Rezeptor IIIA, der die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität der NK-Zellen vermittelt, verglichen mit $52,1 \pm 23,6$ % in Gruppe 1. D. h. die NK-Zellen in Gruppe 2 waren zum einen in der Zahl, zum anderen aber auch in ihrer Fähigkeit zur ADCC überlegen. Doch selbst in Gruppe 2 war die CD16-Expression verglichen mit der der Linie NK3.3 noch hoch, von denen sich lediglich $26,2 \pm 7,8$ % CD16⁺ zeigten. Daher wäre den CB-NK-Zellen auch ein noch höheres antikörperabhängiges, Tumor-eradizierendes Potential zuzutrauen. Eine Limitation der CB-NK-Zellen gegenüber PB-NK-Zellen bzw. den über die Aktivierung peripherer Blutlymphozyten gewonnenen NK3.3 liegt aber in ihrem unreiferen Phänotyp (inhibitorische Rezeptoren \uparrow , Perforin/Granzym B \downarrow)^{174,175}. Die erhöhte CD27-Expression der CB-NK-Zellen spiegelt dies vermeintlich wider: $21,9 \pm 14,4$ % (Gruppe 1) bzw. $83,6 \pm 5,7$ % (Gruppe 2) vs. $3,2 \pm 1,0$ % der NK3.3. Denn CD27⁺ NK-Zellen werden i.S. einer Vorstufe von CD27⁻ NK-Zellen interpretiert, von denen letztere die potenteren Killer verkörpern (Perforin/Granzym B \uparrow)^{134,176}. Unklar ist aber, wie CD27 diese Hemmung vermittelt. Die geringere zytotoxische Potenz der CB-NK-Zellen scheint jedoch durch Stimulierung mit Interleukinen (wie hier IL-2) zumindest teil-kompensiert werden zu können¹⁷⁴.

5.2. Effekte der Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die antitumorale NK-Zell-Antwort

Der im Her2⁺, Herceptin-sensiblen Kokulturmodell explorierte Effekt (für NK3.3 und für CBMC) warf die Folgefrage auf, *wie* Epirubicin bzw. Paclitaxel die antikörperab- und -unabhängige NK-Zell-Zytotoxizität akzentuieren. Dabei wäre denkbar, Anthracycline und Taxane könnten die gegen den Tumor gerichtete NK-Zell-Antwort *entweder indirekt* befördern, indem sie die Her2⁺ Tumorzellen sensibilisieren, *und/oder direkt*, indem sie die NK-Zellen konditionieren.

5.2.1. Effekte auf Tumorzellebene

Die *erste Hypothese* stützt sich bereits auf ein solides, experimentelles Grundgerüst. Denn in der Tat alterieren Anthracycline wie auch Taxane ihre Zielzellen immunogener: *zum einen* durch die Herauf-/Herunterregulierung NK-Zell-aktivierender/-inhibierender Liganden und Todesrezeptoren, *zum anderen* durch die Expression/Emission von „Alarminen“ (vgl. Abb. 37).

NK-Zell-aktivierende Liganden und Todesrezeptoren werden dabei oft auf eine (*DNA damage response*) *DDR* hin hochreguliert. Den *DDR pathway* setzen u. a. auch Genotoxine wie die Anthracycline, die DNA-Addukte und -Doppelstrangbrüche induzieren, (infolge von Hyperploidie aber auch Taxane) in Gang. Detektiert werden diese DNA-Schäden von speziellen Sensoren, (*ataxia teleangiectasia mutated*) *ATM* und (*ataxia teleangiectasia related*) *ATR*, die am Anfang des komplexen *DDR*-Netzwerkes stehen, welches im Idealfall die Reparatur, im Fall irreparabler DNA-Defekte dagegen entweder die Seneszenz oder den Tod der Zelle erwirkt¹⁷⁷. Denn die Aktivierung von *ATM/ATR* initiiert eine Kettenreaktion, i. R. derer die *Checkpointkinasen* *CHK1* (präferentiell von *ATR*) und *CHK2* (präferentiell von *ATM*) phosphoryliert werden, die ihrerseits z. B. *p53* phosphorylieren, welches im Zellkern die Expression von Genen der DNA-Reparatur, des Zellalterungs- oder des Zelltod-Programmes reguliert und die Zelle in ihrem Zellzyklus arretiert¹⁷⁷. Die Datenlage verdichtet sich dahingehend, dass auch die Anthracyclin-/Taxan-abhängige Hochregulierung NK-Zell-aktivierender Liganden und Todesrezeptoren ROS- und *DDR*-abhängig – für Doxorubicin z. B. durch *E2F1* reguliert – abläuft^{178,179}. Unter die heraufregulierten Liganden fallen v. a. die stress-induzierten *MICs* und *ULBPs*, die *NKG2D*, einen der potentesten NK-Zell-Rezeptoren stimulieren (daneben aber auch *DNAM-1*-Liganden)¹⁸⁰. Docetaxel z. B. triggere neben der Expression aktivierender *NKG2D*-Liganden (u. a. auf *BT-474*) auch die von *NKG2D* selbst, einhergehend mit einer gesteigerten *ADCC*¹⁸¹.

Werden die Tumorzellen aber nicht nur (infolge niedriger Konzentrationen) „gestresst“, sondern (infolge höherer Konzentrationen) getötet, exprimieren bzw. emittieren sie in einigen Fällen auch „Alarmine“, durch die die zugrunde gehenden Tumorzellen auf dem Radar der angeborenen Abwehr auftauchen. Eine ganze Reihe konventioneller Chemotherapeutika konnte dabei im letzten Jahrzehnt als (*immunogenic cell death*) *ICD*-Induktoren identifiziert werden, allen voran die Anthracycline¹⁰⁵. Sie werfen eine Signalkaskade an, die eben erst zur Freisetzung dieser (*danger-associated molecular patterns*) *DAMPs* – wie *HMGB1* und *HSP70/90* – führt (vgl. auch Kap. 1.7.2.)¹¹⁰. Ob *DAMPs* auch in diesem Setting eine Rolle spielten, ist aber fraglich, da *DAMPs* primär *DCs* alarmieren. Neben dem „three-step model“ des *ICD*, in dem die *DCs* entscheidend sind, wurde aber alternativ auch ein „two-step model“ postuliert, in dem eine Hybrid-NK/*DC*-Zelle, die antigenen Peptide getöteter Tumorzellen direkt den *T*-Zellen darbietet (vgl. auch Kap. 5.2.2.3.)^{182,J}. Zwar ist die Relevanz der *DAMPs* im Hinblick auf die Aktivierung von *NK*-Zellen noch nicht ganz klar, gezeigt werden konnte aber u. a. bereits, dass emittiertes *HMGB1* *NK*-Zellen in Richtung ihrer Zielzellen

^J „three-step model“: 1. Tötung der Tumorzelle z. B. durch *NK*-Zelle oder direkt Chemo-induziert → 2. Aufnahme, Prozessierung und Präsentation der Tumorzell-Antigene durch *DC* → 3. Priming der *T*-Zelle vs. „two-step model“: 1. Tötung der Tumorzelle als auch Aufnahme, Prozessierung und Präsentation der Tumorzell-Antigene durch eine *NK/DC* → 2. Priming der *T*-Zelle. *NK/DC* bzw. *IKDC* (interferon producing killer dendritic cell) = Zelle, die auf exogene Stimuli hin *NK*- und *DC*-Funktionen in sich vereint.¹⁸²

rekrutiert und exponiertes HSP70 die Zielzellyse triggert¹⁸³. In vitro können diese Wechselbeziehungen jedoch nicht untersucht werden.

Für Taxane wurde ferner die Induktion einzelner Zytokine in Tumorzellen belegt, wie z. B. die von IL-8 durch Lee et al., die dem Interleukin in einer anderen Arbeit auch einen anti-tumorigenen Effekt attribuieren konnten^{184,185}. Durch Modifizierung des Zytokinmusters im Tumormikromilieu könnten sie indirekt NK-Zellen stimulieren, jedoch auch gegenteilig agieren.

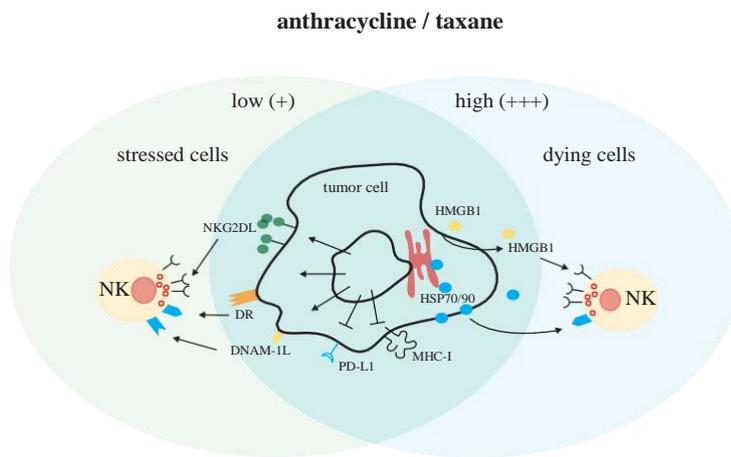


Abbildung 37: Effekte der Anthracycline/Taxane auf die Tumorzellen und dadurch potentiell auch auf die Tumor-NK-Zell-Interaktion. [modifiziert nach Zingoni et al.¹⁸³]

Niedrige Dosen scheinen eher Zellstress/-seneszenz (DNA damage response-Signalkaskade → NKG2DL ↑ /DNAM-1L ↑), hohe Dosen eher (immunogenen) Zelltod zu triggern (Danger-Signalkaskade → DAMPs ↑).

	Tumorzellen/-zelllinien	Effekt	Referenz
Anthracycline			
– Doxorubicin	– Leukämiezelllinien (HL-60, U937, JURKAT)	– DR5 ↑ (p53-unabh.)	Wen et al. ¹⁸⁶
	– Diverse Tumorzelllinien (NCI-H460, NCI-H1944, NCI-H596, NCI-H522, Calu-1, A549, LNCaP, DU-144, MCF-7 , MDA-MB-231 , MDA88Ln, SqCC/Y1)	– DR4 ↑ (p53-abh.) – DR5 ↑ (p53-unabh.) – Fas ↑ (p53-abh.)	Guan et al. ¹⁸⁷
	– Diverse Tumorzelllinien (Hep G2, AGS, Hs 746T, MCF-7)	– Fas ↑ (p53-abh.)	Müller et al. ¹⁸⁸
	– Myelomzelllinien (RPMI-8226, SKO-007(J3)) – Primäre Plasmazellen von Patient*innen mit Multiplem Myelom (ex vivo)	– MICA/-B ↑ – PVR (CD155) ↑	Soriani et al. ^{179,180}
– Epirubicin	– Mammakarzinomzelllinien (MCF-7 , SK-BR-3 , MDA-MB-453)	– MICA ↑ – ULBP 1 + 2 ↑ – Fas ↑	Feng et al. ¹⁸⁹

Taxane			
– Docetaxel	– Diverse Tumorzelllinien (K-562, HCT-116, Hep G2)	– MICA ↑ – ULBP1-3 ↑	Acebes-Huerta et al. ¹¹³
	– Mammakarzinomzelllinien (BT-474, MDA-MB-361)	– MICA/-B ↑ nach 6-12 h, nach 24 h (↓) – ULBP1+2 ↑ nach 6-12 h, nach 24 h (↓)	Di Modica et al. ¹⁸¹
– Paclitaxel	– Ovarialkarzinomzelllinien (OVCA-420, OVCA-429) – Primäre Ovarialkarzinomzellen	– IL-8 ↑ (mRNA, Protein)	Lee et al. ¹⁸⁴
	– Mammakarzinomzelllinien (MCF-7, ZR-75-1)	– IL-1β ↑ (mRNA)	White et al. ¹⁹⁰
	– Mammakarzinomzelllinie (DA-3 [murin], MDA-MB-231*)	– G-CSF, GM-CSF*, IL-1β*, IP-10, iNOS, MIP-2 ↑ (mRNA)	Zaks-Zilberman et al. ¹⁸⁵

Tabelle 32: Effekte der Anthracycline/Taxane auf die Tumorzellen und dadurch potentiell auch auf die Tumor-NK-Zell-Interaktion. ↑ = erhöhte Expression, (↑) = Trend zu erhöhten Expression, ↓ = erniedrigte Expression, (↓) = Trend zur erniedrigten Expression. NKG2D-Liganden (NKG2DL): MHC class I polypeptide-related sequences A/B (MICA/-B), UL16 binding proteins 1-6 (ULBP1-6). DNAM-1-Liganden (DNAM-1L): poliovirus receptor (PVR), poliovirus receptor-related 2 (PVRL2 = Nectin-2).

5.2.2. Effekte auf NK-Zellebene

Für die *zweite Hypothese*, wonach Anthracycline bzw. Taxane NK-Zellen konditionieren oder – allgemeiner – Änderungen auf NK-Zellebene induzieren könnten, existieren hingegen nur wenige Belege, weswegen wir diese fokussierten. Da die Induktion antikörperabhängiger NK-Zell-Zytotoxizität nur für Epirubicin eindeutig war (BT + NK + T vs. BT + NK + T + E: statistisch signifikant; vs. BT + NK + T + P: nicht signifikant), wurde v. a. der Epirubicin-Einfluss untersucht.

5.2.2.1. Phänotyp der NK-Zellen

Um potentielle (Anthracyclin-/Taxan-abhängige) Änderungen auf NK-Zellebene aufzudecken, wurde u. a. die Expression vierer NK-Zell-typischer CD-Oberflächenantigene, die von CD56, CD16, CD27 und CD137, vergleichend analysiert. Da NK3.3 die beiden letzteren nicht nennenswert exprimierten, wird hier nur die differentielle Expression ersterer diskutiert. Die Frequenz CD56⁺ bzw. CD16⁺ NK-Zellen zeigte sich von den Kultivierungsbedingungen weitgehend unbeeinflusst (CD56⁺: ≈ 90 % der über NKp46 identifizierten NK-Zellen, CD16⁺: ≈ 25 %). Nur in der BT + NK + T + E-Bedingung lag der Anteil an CD56⁺ NK-Zellen (nach 72 h) deutlich niedriger, in der NK + E-Bedingung der der CD16⁺ NK-Zellen deutlich höher. Bei Betrachtung der *fluorescence intensities* von CD 56 (V450) und CD16 (PE) divergierten dagegen (nach 48 und 72 h) alle Epirubicin-haltigen Bedingungen. Die MFIs würden eine durch Epirubicin-induzierte Expression von CD56 bzw. CD16 suggerieren, die (die Isotyp-Kontrollen berücksichtigenden) SIs dagegen

das Gegenteil: Denn die niedrigeren SIs legen letztlich nahe, dass die höheren MFIs nach Epirubicin-Behandlung eher auf eine gesteigerte unspezifische Hintergrund- als auf eine spezifische Fluoreszenz zurückzuführen sind, die – im Gegenteil – niedriger zu sein scheint. Die höhere Hintergrundfluoreszenz beruht am ehesten auf der Eigenfluoreszenz von Epirubicin, die zu Überlappungen mit den Emissionsspektren der Fluorochrom-gekoppelten AK geführt haben kann und die Interpretation derer Intensitäten erschwert.

Dass darüber hinaus nicht mehr Differenzen detektiert werden konnten, kann der (in-vitro-)Wirklichkeit entsprechen oder aber ein „Artefakt“ abbilden. Denn die kontinuierliche Kultivierung mit IL-2 versetzt NK3.3 vermeintlich bereits in Ruhe in einen künstlichen, konstitutiven Killingmodus, sodass sie ansatzabhängig kaum noch anstoßbar bzw. aktivierbar sind.

5.2.2.2. Perforin- und IFN- γ -Produktion der NK-Zellen

Der Beweis einer ADCC-Induktion durch Epirubicin hätte neben einer CD16- aber u. a. auch über eine Induktion der Perforin-Produktion in der BT + NK + T + E- gegenüber der BT + NK + T-Bedingung geführt werden können. Denn wie einleitend erörtert, töten (direkt wie indirekt antikörperabhängig) aktivierte NK-Zellen ihre Zielzellen, insb. indem sie zielgerichtet zytolytische und zytotoxische Proteine – Perforin und Granzyme – exozytieren: Durch Zytokine wie z. B. IFN- γ greifen NK-Zellen aber auch immuneditierend ein. Insofern hätte eine in der BT + NK + T + E- gegenüber der BT + NK + T-Bedingung gesteigerte IFN- γ -Synthese einen eher immuneditierenden Epirubicin-Effekt suggeriert. Jedoch wurde weder die Perforin- noch die IFN- γ -Produktion in der Kokultur + Herceptin + Epirubicin (vs. der Kokultur + Herceptin) induziert, wobei NK3.3 IFN- γ schlicht nicht (nennenswert) zu synthetisieren scheinen. In den ersten Versuch wurden NK3.3 eingesetzt, die (wie üblich) mit IL-2 kultiviert wurden: $\approx 75\%$ der IL-2 stimulierten NK3.3 synthetisierten bereits „in Ruhe“ Perforin. Die Kokultivierung und die Kokultivierung + Herceptin – nicht jedoch die Kokultivierung + Herceptin + Epirubicin – triggerte die Perforin-Produktion tendenziell ($n = 1!$) – ein Trend, der in einer anderen Arbeit der AG ($n \geq 3$) aber nicht hatte erhärtet werden können. Die potentiellen Effekte auf die (konstitutiv hohe) Perforin-Produktion der (IL-2 stimulierten) NK3.3 waren eher gering. Mit dem Ziel deutlichere Differenzen offenzulegen, wurde deswegen ein IL-2-Entzugsversuch unternommen (24 h IL-2-Entzug vor Experimentbeginn \pm IL-2 zum Experimentbeginn). Von den „entzügigen“ NK3.3 produzierten nur noch $\approx 7,5\%$ Perforin (bzw. $\approx 20\%$, wenn diese zu Experimentbeginn wieder mit IL-2 stimuliert wurden). Deutlichere Differenzen zw. den Kultivierungsbedingungen (Kokultur \pm Herceptin \pm Epirubicin) traten aber auch hier nicht zu Tage.

Das Nicht-Beobachten relevanter Effekte könnte auch der Konzeption der Experimente geschuldet gewesen sein. Die Zellkulturbedingungen – z. B. Alter der NK3.3, Dichte der NK3.3, Kokultivierungszeit – könnten eine Rolle gespielt haben. Daneben könnte aber auch die Methodik – u. a. die Auswahl der Proteintransportinhibition (hier: Monensin), der Fixation (hier: Paraformaldehyd) oder der Permeabilisation (hier: Saponin) – den Ausgang der Experimente beeinflusst haben. Daher wäre es sicher sinnvoll, das Versuchsprotokoll weiter zu optimieren.

5.2.2.3. Proteinexpression der NK-Zellen

Die Zytokin- und Proteinprofilierung der NK-Zellen stützte sich außer auf FACS-Analysen auch auf einen Antibody-Array (*scioCD antibody array*, *Sciomics*), der Aufschluss über deren „Proteom“ geben sollte. Der Terminus Proteom als „*total protein complement of a genome*“ wurde Mitte der 1990er-Jahre durch Wilkins angelehnt an den Terminus Genom eingeführt¹⁹¹. Er beschreibt die zu einem *definierten Zeitpunkt* und unter *definierten Bedingungen* von einer Zelle oder einem Verbund von Zellen exprimierte Proteine. Der Mehrwert der Proteomik besteht insofern insb. im Vergleich von Proteomen. Denn durch ein Übereinanderlegen der Proteinkarten erkrankter vs. nicht erkrankter oder (wie hier) behandelter vs. nicht behandelter Zellen können (ggf. gar kausale) pathologische oder pharmakologische Änderungen auf Proteinebene aufgedeckt werden¹⁹².

Ein ähnliches Ziel wurde auch hier verfolgt, aber auf ein Protein-Panel (81 CD-Antigene und weitere relevante Proteine) konzentriert. Es sollten die Effekte von Herceptin, Epirubicin und Herceptin kombiniert mit Epirubicin auf die Proteinexpression der NK-Zellen (NK3.3) in Kokultur mit Herceptin-sensiblen Her2⁺ Tumorzellen (BT-474) ergründet werden. Um nur die Effektorzellen (NK3.3) zu untersuchen, wurden die Her2⁺ Tumorzellen vor der Proteingewinnung depletiert. Dies leitet zur primären präanalytischen Fehlerquelle, nämlich der Verunreinigung durch Tumorzellproteine, über. Nach Aufreinigung wurde daher die „Reinheit“ der Proben verifiziert, wobei die Frequenz Her2⁺ Zellen für alle Proben $\leq 1,2\%$ lag (unbehandelte Probe: 0,3 %; Herceptin-Probe: 0,4 %; Herceptin + Epirubicin-Probe: 1,2 %).

Die Detektion von Tumorzellproteinen ist jedoch nicht notwendigerweise mit einer Verunreinigung gleichzusetzen: Denn NK-Zellen können diese auch i. R. ihrer Zell-Zell-Interaktion, v. a. via ihrer (*NK cell immunologic synapse*) NKIS, akquirieren¹⁹³. Eine derartige Übertragung wurde u. a. bereits für MICB (Tumorzellen → NK-Zellen) und seinen korrespondierenden Rezeptor NKG2D (NK-Zellen → Tumorzellen) beschrieben¹⁹⁴. Unklar ist, ob dieser Transfer quantitative Relevanz hat. Wenigstens sollte er aber bei der Diskussion der einzelnen, differentiell exprimierten Proteine, die nun folgt, bedacht werden.

Die Analyse der differentiellen Expression des definierten Protein-Panels führte *Sciomics* durch.

BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab vs. BT-474 + NK3.3

pan HLA class II/HLA-DR/HLA-DP ↑

Synonyme: human leukocyte antigen class II (HLA class II), major histocompatibility complex class I (MHC class II)

Bei einem Vergleich des Trastuzumab-behandelten mit dem nicht behandelten Ansatz fällt zunächst auf, dass die NK-Zellen im Antikörper-Ansatz HLA-II-Proteine (pan HLA class II, HLA-DR/-DP) gegenüber der Kontrolle überexprimieren. Dieses Ergebnis verwundert, da die MHC-II-Expression i. A. auf professionelle Antigen-prozessierende und -präsentierende Zellen (APC) restringiert ist, wozu NK-Zellen gemeinhin nicht gerechnet werden. Aktivierte (wie IL-2 stimulierte) NK-Zellen exprimieren aber entgegen der allgemeinen Annahme HLA-II-Antigene, vorwiegend HLA-DR¹⁹⁵. Auch NK3.3 hatten sich i. R. ihrer initialen Phänotypisierung durch Kornbluth et al., auf die die Kultivierung dieser NK-Zelllinie zurückgeht, als HLA-DR⁺ herausgestellt ($> 99\%$)¹²². Mehr noch, die Datenlage deutet auf APC-ähnliche Fähigkeiten der NK-

Zellen hin: HLA-DR⁺ NK-Zellen könnten prinzipiell lösliche Proteine prozessieren und deren Peptide MHC-II-restringiert CD4⁺ T-Zellen unterbreiten, die infolge proliferieren, arbeiteten Roncarolo et al. auf¹⁹⁶. Neben ihrer (wenn auch niedrigen) Aktivität als APC agierte die kleine Fraktion der HLA-DR⁺ NK-Zellen bei Burt et al. auch als effiziente Killereinheit¹⁹⁷. Hanna et al. propagierten gar, NK-Zellen könnten Tumorzellen töten, dann durch Hochregulierung von MHC-II- und ko-stimulierenden Molekülen einen APC-ähnlichen Phänotyp akquirieren und derart die antigenen Peptide der getöteten Tumorzellen direkt T-Helfer-Zellen darbieten: Killer- würden zu Helfer-Zellen werden und derart angeborene und adaptive Anti-Tumor-Antwort überbrücken^{198,199}.

Ob NK-Zellen aber wirklich wie dendritische Zellen naive, nicht-aktivierte T-Helfer-Zellen primen können, lässt sich nicht beantworten. Ein Priming von T-Helfer-Zellen verlangt nämlich neben der aktivierenden T-Zell-Rezeptor-Bindung an den Antigen-beladenen HLA-II-Komplex (Signal 1) noch einen zweiten, ko-stimulierenden Impuls (Signal 2) sowie instruierende Zytokine (Signal 3)²⁰⁰. Dieser ko-stimulierende Impuls wird durch die Wechselwirkung sog. Ko-Rezeptoren, wie CD28 (T-Zelle) mit CD80 (= B7-1; APC) oder CD86 (= B7-2; APC), vermittelt²⁰¹. Immerhin konnten im Proteom einer NK-Zell-Linie (YTS) bereits Peptide ko-stimulierenden Moleküle (CD86, CD11a und CD11c) detektiert werden²⁰². Ebenfalls unbeantwortet bleibt die Frage, ob Herceptin die MHC-II-Mehrexpression direkt oder (intuitiver) indirekt nach antikörperabhängiger Aktivierung befördert und ob dies zu einer de novo Expression von HLA-II-Antigenen auf HLA-II⁻ NK-Zellen führt oder ob v. a. HLA-II⁺ NK-Zell-Klone zum Proliferieren angeregt werden^{195,203}.

Jedenfalls konnte die Proportion HLA-DR⁺ NK-Zellen im klinischen Kontext bereits mit einem besseren Outcome korreliert werden: In einer Phase-I-Studie mit aggressiver Therapie^K initial refraktärer Tumorpatient*innen, konnte eine hohe HLA-DR⁺ Fraktion als positiver Prädiktor der Überlebensrate (*progression free survival PFS* und *overall survival OS*) identifiziert werden²⁰⁴.

In jedem Fall kumuliert die Evidenz, NK-Zellen könnten nicht nur die erste Verteidigungslinie des Immunsystems stellen, sondern vielseitiger involviert sein und sogar selbst „adaptiv“ agieren. Letzteres legen dabei u. a. auch jüngere Daten von Nikzad et al. nahe. In ihrem Immunisierungs- (gegen HIV) und Re-Infektionsmodell (mit VZV) konnten die NK-Zellen zum einen Antigene erinnern und zum anderen auch noch nach Jahren eine gezielt gegen diese Antigene gerichtete Antwort evozieren („antigen-specific recall responses“)²⁰⁵.

CD45RA ↑

Synonyme: leucocyte common antigen (LCA), protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC)

Das human leucocyte antigen (HLA) CD45 wurde – da von allen Leukozyten exprimiert – anfangs auch leucocyte common antigen (LCA) genannt. Eine alternative Bezeichnung des Pan-Leukozyten-Antigens, protein tyrosine phosphatase, receptor type, C (PTPRC), fokussiert seine Funktion: Es repräsentiert den

^K IL-2, Imatinib, Cyclophosphamid

Prototyp Rezeptor-ähnlicher Protein-Tyrosin-Phosphatasen (RPTPs, Klasse R1)^{206,207}. In Bezug auf T-Zellen wissen wir bereits viel über dessen Rolle, im Kontext von NK-Zellen hingegen nur wenig.

Abhängig von alternativem Splicing (Exons A, B, und C) sowie der Glykosylierung tritt es in diversen Iso- (CD45RABC bis CD45R0) wie Glykoformen in Erscheinung, die zum einen von den einzelnen Leukozytenlinien, aber zum anderen auch von den Differenzierungsstufen einer einzelnen Leukozytenlinie differentiell exprimiert werden²⁰⁷. Die längeren Varianten, wie -RA, identifizieren naive T-Zellen, wohingegen die komprimierte Isoform -R0 auf deren Aktivierung hin hochreguliert wird: Sie kennzeichnet Memory-T-Zellen²⁰⁷. Analog vermutete die Gruppe um Fu in NK-Zellen mit der R0-Isoform memory-like NK-Zellen²⁰⁸. Und auch Krzywinska et al. grenzten – angelehnt an die T-Zell-Phänotypen – aktivierte, Tumorzell-attackierende CD45RA⁺R0⁺ NK-Zellen gegen nicht aktivierte CD45RA⁺R0⁻ NK-Zellen ab²⁰⁹. Sie stellten aber auch fest, dass der R0-Phänotyp bei NK-Zellen – anders als bei T-Zellen – verglichen mit dem RA-Phänotyp äußerst rar sei. Die NK-Zell-Aktivität und die Koexpression konventioneller NK-CD-Antigene (wie CD56 und CD16) analysierend zogen sie den Schluss, CD45RA^{dim} NK-Zellen stellen ein energieeffizientes, ruhendes Reservoir dar, das nach Aktivierung zu CD45RA^{bright} NK-Zellen differenziert²¹⁰. Diese beschriebenen Isoformen betreffen dabei die variable N-terminale Domäne, die nach extrazellulär ragt. Die intrazellulären potentiellen PTP-Domänen, D1 und D2, sind hingegen hoch konserviert: D1 agiert als PTPase, die distale D2, eine Pseudo-PTPase, übt regulierenden Einfluss²⁰⁷. Für T- wie B-Lymphozyten konnte die konkrete Funktion der PTPRC, die deren Antigen-abhängige Aktivierung befördert, bereits rekonstruiert werden: Durch Dephosphorylierung eines inhibitorischen Tyrosinrestes aktiviert sie src-Kinasen, die am Anfang der Signaltransduktionskaskade der T- und auch B-Zell-Antigenrezeptoren stehen (Src-Kinasen → ITAM-Phosphorylierung → Syk-Kinasen)^{211,L}. Für NK-Zellen, die nicht über Antigenrezeptoren verfügen, ist ihre Bedeutung hingegen noch nicht hinreichend ergründet. Anders als T-Zellen scheinen NK-Zellen deren Defizienz (mindestens teil-)kompensieren zu können²¹². Die Datenlage deutet darauf hin, dass die PTPase wesentlich in deren (ITAM-abhängige) Zytokin- wie Chemokinproduktion, jedoch nur unwesentlich in deren (auch ITAM-abhängige) direkte wie indirekte antikörperabhängige Zytotoxizität involviert zu sein scheint^{213,214}.

CD34 ↑

Synonyme: hematopoietic progenitor cell antigen CD34

CD34 charakterisiert hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen. Wie die beiden anderen lymphatischen Reihen, B- und T-Lymphozyten, leiten sich auch humane NK-Zellen am ehesten von oligopotenten lymphatischen Progenitorzellen (*common lymphoid progenitor CLP*) ab, die – wie die myeloischen Progenitorzellen (*common myeloid progenitor CMP*) – letztlich auf die sich selbst erneuernden CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cell HSC*) des Knochenmarks zurückgehen²¹⁵. Jüngere Erkenntnisse ziehen die Doktrin eines exklusiv lymphoiden Ursprungs jedoch in Zweifel²¹⁶. Und noch

^L Durch die Dephosphorylierung von Phosphotyrosinen im katalytischen Zentrum der src-Kinasen können PTPRCs diese jedoch ebenso inhibierend regulieren. Darüber hinaus agieren PTPRCs auch als Jak-Phosphatasen, die bzw. deren Jak-STAT-Signalweg sie durch Dephosphorylierung behindern. Januskinasen (Jak) assoziieren z. B. mit Zytokinrezeptoren, da diese keine intrinsische Kinase-Aktivität haben.

weniger Einigkeit herrscht über die (sequentiellen) Reifungsschritte und -orte (innerhalb und/oder auch außerhalb des Knochenmarks insb. in Lymphknoten)^{217,218}. Wenngleich der Reifungsprozess von NK-Zellen noch nicht lückenlos rekonstruiert werden konnte, wurde u. a. von Caligiuri ein fünfstufiges Reifungsmodell skizziert: Dort differenzieren CD34⁺ CD45RA⁺ pro- und pre-NK-Zellen (*NK Precursor NKP*), die die Expression von IL-2R β (CD122) kennzeichnet, zu unreifen, in ihrer Linie determinierten NK-Zellen (*immature NK [iNK] cells*). Die darauffolgende, vierte Generation beschreibt bereits die zytokinproduzierenden, insb. in den Lymphknoten residierenden CD56^{bright} CD16^{-/+} NK-Zellen, die zuletzt zu den zytotoxischen CD56^{dim} CD16⁺ NK-Zellen reifen, die die Blutbahn patrouillieren.²¹⁹

Die erhöhte Expression von CD34 und CD45RA im Antikörper-Ansatz legt die Interpretation nahe, die Antikörpertherapie rege v. a. die Progenitorzellfraktion der NK3.3 zum Proliferieren an. Die aufgeworfene Folgefrage, ob die Proliferation der NK-Vorläufer einen Vor- oder Nachteil bedeutet, kann aber nur unbeantwortet in den Raum gestellt werden.

BDNF \uparrow

Synonyme: brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

Auch das vierte differentiell exprimierte Protein, BDNF, verblüfft. Denn BDNF gehört zu den Neurotrophenen, die eher im Nervensystem, wo sie für die Reifung neuer sowie den Schutz existierender Neurone essentiell sind, verortet werden. BDNF und sein bevorzugter Rezeptor Tropomyosin-related kinase B (TrkB) werden aber auch von einer Reihe neuronaler wie nicht-neuronaler Tumore hochreguliert, die gegenüber vielen weit verbreiteten Chemotherapeutika, auch Anthracyclinen, resistent sind²²⁰. Deren Resistenz rührt u. a. in der BDNF-abhängigen Aktivierung von TrkB, die eine erhöhte Aktivität des PI3K/Akt-Pathway zur Folge hat²²¹.

Unter die erwähnten nicht-neuronalen Tumoren fällt auch Brustkrebs. Denn in Brustkrebsgewebe wurde eine gegenüber gesundem Drüsengewebe erhöhte BDNF-Expression detektiert, die ein schlechteres klinisches Outcome prädierte: u. a. eine höhere Rate lokaler Rezidiv, Metastasierung und letztlich Letalität^{222,223}. Auch in einem Vergleich resezierten Brustkrebsgewebes rezidivierender vs. nicht-rezidivierender triple-negativer BC korrelierte die Aktivierung des BDNF-Pathway mit der Rezidivierung der Tumore²²⁴. Neben einem vermeintlich vorrangig autokrinen wird auch ein parakriner Sekretionsmodus diskutiert. Unter der Annahme eine (parakrine) BDNF-abhängige TrkB-Aktivierung könne v. a. dort, wo BDNF quantitativ relevant (von Gliazellen) produziert wird, d. h. im ZNS, eine entscheidende Rolle spielen, studierten Choy et al. zerebrale Her2⁺ Metastasen (aber auch triple-negative Filiae). Sie stellten fest, dass BDNF Her2⁺ Brustkrebszellen begünstige, *erstens* diese Nische zu kolonisieren und *zweitens* dort zu proliferieren. Auf zellulärer Ebene legten ihre Daten zugrunde, BDNF befördere die Heterodimerisierung seines korrespondierenden Rezeptors TrkB mit Her2 – eine alternative Interaktion, die den Her2⁺ Zellen vermeintlich nicht nur im ZNS zu entscheidendem Vorteil gereichen könnten²²⁵. Denn solcher sog. „Tyrosinkinase-Crosstalk“, wie er bereits für Her2 und Her1, Her3, ER, IgF-1-R oder c-MET-R beschrieben ist, stellt einen relevanten Trastuzumab-Resistenzmechanismus dar²²⁶.

Auch aktivierte Immunzellen, u. a. NK-Zellen, produzieren z. T. in hohen Konzentrationen BDNF²²⁷. In diesem Versuchssetting übertreffen die NK-Zellen der AK-therapierten Kokultur die der Kontroll-Kokultur gar in ihrer BDNF-Produktivität. Eine gesteigerte BDNF-Sekretion könnte so zu einer gesteigerten TrkB-Her2-Heterodimersierung führen und den Herceptin-Effekt unterminieren. BDNF könnte (hypothetisch) aber auch auto- oder parakrin die NK-Zell-Antwort akzentuieren.

CD63 ↑

Synonyme: granulophysin, lysosomal-associated membrane (glyco-)protein (LAMP-3), melanoma-associated antigen ME491 (ME491), MLA1, ocular melanoma-associated antigen (OMA81H), tetraspanin-30 (TSPAN30, Tspan-30)

Zuletzt wird noch CD63 in der Herceptin-Kokultur überexprimiert: ein Tetraspanin, d. h. ein Transmembranprotein, das Membranen mehrfach durchspannt (4 x). Aufgrund der hohen Expressionsdichte auf Exosomen dient es u. a. – wie auch andere Vertreter der Gruppe (CD9, CD37, CD81 und CD82) – deren Identifikation.²²⁸

Exosomen sind 40-100 nm kleine Vesikel, die sich ins Lumen von Endosomen abnabeln (*inward budding* → *multivesicular bodies MVBs* mit *intraluminal vesicles ILVs*), ehe sie von diesen in den Extrazellulärraum abgegeben werden. Neben den größeren im Mittel 100-1000 nm messenden Mikrovesikeln (Ektosomen), die sich direkt aus der Plasmamembran nach außen abschnüren (*outward blebbing*) stellen sie die zweite Gruppe zirkulierender Vesikel^{M,229,230}. Sie dienen nicht (nur) – wie lange angenommen – der Entledigung unnützer Peptide bzw. Proteine, sondern werden im Gegenteil ganz gezielt beladen²³¹. Die selektive Sortierung vollzieht sich vorwiegend ESCRT-supervidiert (*endosomal sorting complex required for transport ESCRT-0, -I, -II, -III*), läuft aber auch unabhängig davon ab²³². Für die Zellen sind sie wichtige Werkzeuge interzellulärer Kommunikation²³³. Sie werden u. a. auch von NK-Zellen sezerniert. Neben Exosomen- (CD63⁺) sowie NK-Zell- (CD56⁺) Proteinen, verfügen diese über deren typische Tötungsinstrumente (Perforin und Fas-Ligand FasL)²³⁴. Zhu et. al zufolge sind sie darin sogar höher konzentriert als in den NK-Zellen selbst²³⁵. Ihre Gruppe lieferte auch empirische Evidenz für die zytotoxische Potenz, die die Exosomen von NK-Zellen *in vitro* wie *in vivo* gegenüber entarteten Zellen entfalten^{235,236}. Mit MHC-defizienten oder MICB-exprimierenden Zielzellen konfrontiert wird ein Teil ihrer CD63⁺ Vesikel in Richtung der (*NK cell immunologic synapse*) NKIS rekrutiert, zeigten zwei andere Gruppen auf^{237,238}. Die Daten von Krämer et al. deuten gar darauf hin, CD63 könnte nicht nur in die Rekrutierung der Vesikel zur NKIS, sondern ebenso in die Rekrutierung der NK-Zellen selbst in Richtung von Zyto- und Chemokinen, d. h. zu Entzündungsherden hin, involviert sein²³⁹.

Wenn von der erhöhten Expression von CD63 denn tatsächlich auf eine gesteigerte Genese von Exosomen geschlossen werden kann, wäre diese – wie die zitierte Literatur nahelegt – positiv zu bewerten. Dabei wäre durchaus denkbar, dass diese Maschinerie in den antikörperabhängig aktivierten NK-Zellen angestoßen wird.

^M Als dritte Gruppe extrazellulärer Vesikel werden von vielen Autor*innen die noch größeren Apoptosekörperchen, in die sich die Zelle i. R. ihres koordinierten Zelltodes zerschnürt, aufgeführt.

BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3

Eotaxin-1 ↑

Synonyme: C-C motif chemokine 11 (CCL11), eosinophil chemotactic protein

Zwischen diesen beiden Ansätzen, BT-474 + NK3.3 + T + E vs. BT-474 + NK3.3, erlangt nur ein einziges Protein, CCL11, statistische Signifikanz. Und dies könnte dessen Erstbeschreibung im Proteinrepertoire einer NK-Zelllinie sein, denn trotz eingehender Recherche ließ sich kein weiterer Beleg in der Literatur finden. CCL11 ist ein ziemlich kleines Zytokin und in vitro wie in vivo eines der effektivsten Eosinophilen-Chemokine, welches über G-Protein-gekoppelte Chemokin-Rezeptoren, insb. über CCR3, Eosinophile zu Entzündungsherden rekrutiert^{240,241}. Doch nicht nur dorthin. CCL11 lockt, wie auch DAMPs, Eosinophile ebenso in Tumoren²⁴², weswegen sich die Frage aufdrängt, wie Eosinophile im Tumormikromilieu zu bewerten sind. Auch darauf kann die Literatur keine klare Antwort liefern, da deren Rolle – v. a. auch abhängig von der Entität – kontrovers diskutiert wird^{243,244}. Die Indizien, dass *tumour-associated tissue eosinophilia TATE* mit einer besseren Prognose korreliert, überwiegen, jedoch fehlen insbesondere für Brustkrebs eindeutige experimentelle Belege²⁴⁵.

Die meisten Studien adressierten ausschließlich *direkte* zytotoxische Effekte der Eosinophilen ohne ihre Interaktion mit anderen Tumor-infiltrierenden Immunzellen zu hinterfragen, kritisierten Carretero et al. Dessen Gruppe deckte auf, dass die Reduktion der Eosinophilen in Tumoren deren Rejektion *indirekt* kompromittierte: nämlich, indem infolge v. a. auch weniger aktivierte CD8⁺ T-Killerzellen in den Tumor einwanderten, die mitunter erst durch deren Chemokine – insb. CCL5, CXCL9 and CXCL10 – dorthin dirigiert wurden. Gleichzeitig ging die Eosinophilie im Tumor mit einer Abnahme der peripheren Zellzahl einher.²⁴⁶

Eine geringe Anzahl an peripheren Eosinophilen (*tumour-associated blood eosinophilia TABE*) konnte ihrerseits in einem klinischen Follow-up von Her2⁺ BC-Patient*innen, die adjuvant mit Trastuzumab – und in 96,8 % der Fälle auch mit Anthracyclinen und Taxanen – therapiert worden waren, mit einem längeren krankheitsfreien Überleben korreliert werden (70 Monate für $\leq 70 \times 10^3$ Eosinophile/mm³ vs. 45 Monate für > 70 Eosinophile/mm³)²⁴⁷. Folglich wäre denkbar, NK-Zellen könnten in vivo durch CCL11 direkt Eosinophile und durch diese indirekt CD8⁺ T-Zellen in den Tumor locken – und derart erneut angeborene und adaptive Tumor-Immunantwort überbrücken. Im in-vitro-Kokulturmodell kann dies aber keine Rolle gespielt haben.

Während die NK-Zellen in der kombiniert therapierten Kokultur verglichen mit den NK-Zellen in der nicht therapierten Kokultur nur ein Protein differentiell exprimieren, finden sich beim Vergleich mit den NK-Zellen im AK-Ansatz immerhin drei differentiell exprimierte Proteine: IL-1 β , CD15 und CD21.

BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin vs. BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab

IL-1beta ↑

Synonyme: leucocytic pyrogen, mononuclear cell factor, lymphocyte activating factor

IL-1 β wird als Pro-Protein, pro-IL-1 β , produziert, ehe es durch die *Caspase-1*, dem *Interleukin-1 converting enzyme (ICE)*, zu reifem IL-1 β prozessiert wird. Auch die Caspase-1 liegt zunächst als pro-Caspase-1 vor. In

ihre Aktivierung ist ein trimerer Proteinkomplex, das Inflammasom, involviert, das aus 1.) einem Sensorprotein wie z. B. einem *NOD-like-Rezeptor NLR* (bzw. einem NLR-Oligomer), 2.) dem *Adaptorprotein ASC* und 3.) der *Caspase-1* selbst besteht. Die inflammatorische „Kaskade“ hängt dabei von zwei Signalen ab: Das erste Signal^N (PAMPs bzw. DAMPs → TLRs) triggert die Synthese von pro-IL-1 β und NLRs, während das zweite Signal^O (PAMPs bzw. DAMPs → NLRs) die Caspase-1 aktiviert.^{248,249}

Benannt wird das Inflammasom nach dem NLR. Am besten untersucht ist NLRP3 bzw. das NLRP3-Inflammasom. Ebendieses wird wiederum durch Anthracycline aktiviert, mit einer im Ergebnis gesteigerten pro-IL-1 β -Proteolyse sowie IL-1 β -Sekretion²⁵⁰. Eine Anthracyclin-induzierte NLRP3-Aktivierung könnte auch die hier erhöhte IL-1 β -Expression unter Epirubicin erklären. Denn wenngleich IL-1 β eigentlich eher dem Interleukin-Repertoire anderer Immunzellen zugeschrieben wird, wird es auch von NK-Zellen produziert²⁵¹. I. R. von ICD (u. a. infolge einer Anthracyclin-Therapie) kommt (von DCs sezerniertem) IL-1 β eine Schlüsselrolle im Priming tumorspezifischer, zytotoxischer, IFN- γ produzierender T-Zellen zu¹⁰⁹. Und die Antagonisierung von IL-1 β wiederum reduziert die Effizienz Anthracyclin-haltiger Therapieregime²⁵². Darüber hinaus scheint IL-1 β aber auch (indirekt) in die (durch IL-12 stimulierte) IFN- γ -Produktion von NK-Zellen involviert. Hunter et al. arbeiteten nämlich auf, dass anti-IL-1 β -AK die IFN- γ -Produktion der NK-Zellen lahmlegen, die durch Titrieren von IL-1 β wieder in Gang gebracht werden kann²⁵³. Die Gruppe um Cooper demonstrierte ferner, dass IL-1 β plus IL-12 vorrangig die IFN- γ -Produktion der CD56^{bright} NK-Zellen kostimuliert und nur nachrangig die der CD56^{dim} Zellen. Zu der hohen IFN- γ -Produktion trägt in deren Arbeit dabei v. a. eine kleine Fraktion der CD56^{bright} NK-Zellen bei, die eine deutliche IFN- γ -Gen-Induktion zeigt²⁵⁴.

Andererseits wird IL-1 β aber auch eine Tumor-promotende Rolle attribuiert^{255,256}. Auch bei Brustkrebs, wie Wu et al. aufdeckten: Eine gesteigerte IL-1 β -Sekretion (zu der insb. CD11c⁺ myeloische Zellen, inkl. Monozyten und DCs, beitragen) korrelierte in deren Arbeit mit fortgeschrittenen Tumorleiden²⁵⁷. Pro-tumorigene Effekte entfaltet IL-1 β , eines der potentesten pro-inflammatorischen Zytokine, dabei wohl weniger direkt als indirekt, indem es die Zellen im Tumormikromilieu z. B. zur Produktion pro-proliferativer oder pro-angiogenetischer Faktoren anregt.

CD 15 ↓

Synonyme: Lewis x (Le^X), stage-specific embryonic antigen 1 (SSEA-1)

CD15 oder Lewis X (Le^X) ist ein Glykokonjugat (Gal β 1-4[Fuca1-3]GlcNAc). Es zeigt u. a. menschliche myeloide Zellen und eine Mehrexpression deren Differenzierung an^{258,259}. Diese scheint weniger Folge einer de-novo-Synthese durch α 1,3-Fucosyltransferasen als einer Konversion von exprimiertem sialyl-Lewis x (sLe^X) zu Lewis x (Le^X), die α (2,3)Sialidasen katalysieren²⁶⁰. Diese Sialylierung bedingt neben funktionellen Folgen, dass sLe^X und Le^X nicht durch denselben AK detektiert werden. So scheinen NK-Zellen zwar sLe^X-positiv, aber Le^X-negativ zu sein^{261,262}. Wie oben skizziert, ist bereits der Ursprung der NK-Zellen – lymphoid vs. myeloid – nicht eindeutig belegt. Denn die Lehrmeinung einer (exklusiv) lymphoiden

^N Signal 1 vermitteln PAMPs, die an (extrazelluläre) TLRs binden.

^O Signal 2 übermitteln PAMPs bzw. DAMPS, die von (intrazellulären) NLRs erkannt werden.

Linienzugehörigkeit ziehen eine Reihe von in-vitro- wie in-vivo-Experimente in Zweifel, die nahe legen, NK-Zellen könnten auch aus myeloiden Progenitorzellen hervorgehen^{216,263}. Vor einem myeloiden Hintergrund wäre auch eine Le^X-Expression auf NK-Zellen denkbar. Im konkreten Kontext von NK:3.3, die auf periphere Blutlymphozyten zurückgehen¹²², ist die Mehrexpression von myeloidem Le^X auf der NK-Zelloberfläche aber fraglich. Naheliegender erscheint eine Expression im NK-Zellinneren, denn Nakayama et al. konnten zeigen, alle PBMC – incl. CD56⁺ NK-Zellen – exprimieren Le^X intrazellulär, selbst wenn sie dieses nicht wie myeloide Zellen exponieren²⁶⁴. Während die extrazelluläre Expression noch nicht hinreichend, ist die intrazelluläre Expression meines Wissens nach noch gar nicht aufgeklärt. Daher kann hier nur die niedrigere CD15-Expression unter kombinierter Antikörper-Anthracyclin-Therapie konstatiert, aber leider nicht kommentiert werden.

CD 21 ↓

Synonyme: complement receptor type 2, C3d receptor, EBV receptor

Der Komplementrezeptor Typ 2, *complement receptor type 2 CR2*, bindet die degradierten Fragmente von C3, die i. R. aller drei Wege der Komplementaktivierung anfallen: iC3b, C3dg und C3d, wobei die beiden letzteren wiederum proteolytischen Produkten von iC3b entsprechen. Diese C3b-Nebenprodukte sind nicht in die eigentliche Komplementkette verwickelt, sondern Opsonine. Für NK-Zellen ist die Expression des Komplementrezeptors Typ 3 CR3 typisch, die des Komplementrezeptors Typ 2 CR2 indes nicht²⁶⁵.

Mittels CR3 können die NK-Zellen mit iC3b opsonierte Tumorzellen überführen. Die Bindung von löslichem oder gebunden iC3b durch CR3 behindert aber die beiden anderen Effektorfunktionen der NK-Zellen, die direkte wie auch indirekte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), hinter denen erstere, die Komplement-abhängige zelluläre Zytotoxizität (CDCC), zurückbleibt, zeigten Liu et al. in vitro. Ihre in-vivo-Daten erhärteten den Verdacht, dass die Komplementrezeptor-Aktivierung der NK-Zell-Aktivität im Ergebnis abträglich sei: Denn CR3-defiziente NK-Zellen hielten Tumoren effizienter auf²⁶⁶. Dem könnte u. a. zugrunde liegen, dass NK-Zellen inkubiert mit iC3b ihre IFN γ -Produktion herunterregulieren²⁶⁷. In der Annahme, CR2 agiere ähnlich, wäre eine geringere Expression vermeintlich auch mit einem potenteren NK-Zell-Phänotyp assoziiert.

Auch im Allgemeinen wird sehr widersprüchlich diskutiert, inwieweit Komplement zur Tumorregression oder -progression kontribuiert. V. a. die vergangene Dekade brachte nämlich zu Tage, das dessen Aktivierung – anders als lange angenommen – Tumorgenese und -progress unterhalten und auch antreiben kann²⁶⁸.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss einer Anthracyclin-/Taxan-Therapie auf die immunologische Tumorabwehr unter Antikörpertherapie, genauer gesagt auf die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), zu untersuchen. Vorrangig getestet wurde das in einem Anti-Her2-AK-sensiblen Her2⁺ Tumormodell (BT-474). Als Effektorzellen fungierten zum einen NK-Zellen der Linie NK3.3, zum anderen aber auch cord-blood derived MNC, die u. a. polyklonale NK-Zellen enthalten. In beiden Modellen – NK3.3 und MNC – konnte nach 72 h (NK3.3, E:T Ratio 1:1) resp. 24 h (MNC, E:T Ratio 5:1) ein tendenziell (positiver) Einfluss der additiven Anthracyclin (Epirubicin)- und Taxan (Paclitaxel)-Therapie auf die direkte und indirekte antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC) der NK-Zellen – bemessen an der Induktion von Zelltod – festgestellt werden. Jedoch erreichte dieser Effekt nur für Epirubicin im NK3.3-Modell – BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab vs. BT-474 + NK3.3 + Trastuzumab + Epirubicin – statistische Signifikanz ($p = 0,0192$).

Vor diesem Hintergrund drängte sich die Frage auf, wie (v. a.) Epirubicin die Killing-Effizienz der NK-Zellen befördert. Dem Epirubicin-Einfluss könnten dabei (direkte) Effekte auf Tumorzellebene und/oder (indirekte) Effekte auf NK-Zellebene zugrunde liegen. Da die Anthracyclin-induzierte „Immunogenisierung“ von Tumorzellen bereits belegt werden konnte (Heraufregulierung von NK-Zell-aktivierenden Liganden/Todesrezeptoren, Initiation der Danger-Signalkaskade), wurde v. a. nach einer Anthracyclin-getriggerten „Konditionierung“ der NK-Zellen gefahndet. Die Zytokin- und Proteinprofilierung der NK-Zellen stützte sich dabei sowohl auf FACS-Analysen (intra- und extrazelluläre Färbungen) als auch auf einen Antibody-Array (scioCD antibody array, Sciomics). Zu diesem Zweck wurde zum einen die Expression vierer charakteristischer NK CD-Antigene (CD56, CD16, CD27 und CD137) analysiert, von denen die NK-Zellen (NK3.3) nur CD56 und CD16 nennenswert exprimierten und deren Expression (MFI) nach Epirubicin-Behandlung eher erniedrigt war. Zum anderen wurde untersucht, ob Epirubicin die zytotoxische Potenz (Readout-Parameter: Perforin-Produktion) beeinflussen kann, wobei in den Vorversuchen keine größeren Differenzen detektiert werden konnten. Dies könnte am ehesten der konstitutiv hohen Perforin-Expression der (in diesem Setting kontinuierlich IL-2 stimulierten) NK-Zellen geschuldet sein. Der Antibody-Array förderte dagegen die differentielle Expression einer Reihe von Proteinen zu Tage. In der kombinierten Anthracyclin + Anti-Her2-Antikörper-therapierten Kokultur wurde – verglichen mit der untherapierten Kokultur – nur Eotaxin-1 überexprimiert, welches indirekt in die Rekrutierung CD8⁺ T-Zellen involviert sein könnte, was in diesem simplen in-vitro-Modell aber keine Rolle gespielt haben kann. Zwischen der Anthracyclin + Anti-Her2-Antikörper-therapierten und der Anti-Her2-Antikörper-therapierten Kokultur war die Expression von IL-1 β statistisch signifikant erhöht, die von CD15 und CD21 hingegen signifikant erniedrigt. Ersterem scheint i. R. des immunogenen Zelltod, wie er u. a. durch Anthracycline induziert wird, eine Schlüsselrolle beim Priming tumorspezifischer CD8⁺ T-Zellen zuzukommen. Eine konkrete Bewertung bleibt in diesem simplen Setting (ohne CD8⁺ T-Zellen) aber schwierig.

Zusammenfassend kann ein positiver Effekt der kombinierten Anthracyclin- und – geringer – auch der Taxan-Therapie konstatiert werden, der indirekt wie direkt auch NK-Zellen in ihrer Anti-Tumor-

Immunantwort in vitro zu triggern scheint. Indirekte Effekte, die die komplexe Interaktion mit anderen Tumor-infiltrierenden Immunzellen betreffen, konnten in diesem in-vitro-Modell aber nicht untersucht werden. Womöglich könnte die NK-Zelle nämlich nicht nur als Killer-, sondern auch als „Helfer“-Zelle agieren, die das Tumormikromilieu modifiziert.

7. Literaturverzeichnis

1. Ehrlich P. *Beiträge zur experimentellen Pathologie und Chemotherapie* (Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig 1909).
2. Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Progress in experimental tumor research* 13, 1–27 (1970).
3. Gross L. Intradermal Immunization of C3H Mice against a Sarcoma That Originated in an Animal of the Same Line. *Cancer Research*, 326–333 (1943).
4. Foley E.J. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Research* 13, 835–837 (1953).
5. Prehn, R.T. & Main J.M. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas. *Journal of the National Cancer Institute* 18, 769–778 (1957).
6. van der Bruggen, P. *et al.* A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647 (1991).
7. Brichard, V. *et al.* The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *Journal of Experimental Medicine* 178, 489–495 (1993).
8. Coulie, P.G. *et al.* A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 7976–7980 (1995).
9. Dunn, G.P., Old, L.J. & Schreiber, R.D. The three Es of cancer immunoediting. *Annual Review of Immunology* 22, 329–360 (2004).
10. Sury, K., Perazella, M.A. & Shirali, A.C. Cardiorenal complications of immune checkpoint inhibitors. *Nature Reviews Nephrology* 14, 571–588 (2018).
11. Janeway, C.A. Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 54, 1–13 (1989).
12. Matzinger, P. The danger model. A renewed sense of self. *Science* 296, 301–305 (2002).
13. Saksela, E. *et al.* Morphological and functional characterization of isolated effector cells responsible for human natural killer activity to fetal fibroblasts and to cultured cell line targets. *Immunological Reviews* 44, 71–123 (1979).
14. Godfrey, D.I. *et al.* NKT cells. Facts, functions and fallacies. *Immunology Today* 21, 573–583 (2000).
15. van Acker, H.H. *et al.* CD56 in the Immune System. More Than a Marker for Cytotoxicity? *Frontiers in Immunology* 8, Article 892 (2017).
16. Cooper, M.A., Fehniger, T.A. & Caligiuri, M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22, 633–640 (2001).
17. Cooper, M.A. *et al.* Human natural killer cells. A unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 97, 3146–3151 (2001).
18. Warnock, R.A. *et al.* Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *Journal of Experimental Medicine* 187, 205–216 (1998).
19. Campbell, J.J. *et al.* Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *Journal of Immunology* 166, 6477–6482 (2001).
20. Jacobs, R. *et al.* CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology* 31, 3121–3127 (2001).
21. Vivier, E. *et al.* Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 12, 239–252 (2012).
22. Kärre, K. *et al.* Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319, 675–678 (1986).
23. Ljunggren, H.G. & Kärre, K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today* 11, 237–244 (1990).
24. Yokoyama, W.M. & Kim, S. How do natural killer cells find self to achieve tolerance? *Immunity* 24, 249–257 (2006).
25. Raullet, D.H. & Vance, R.E. Self-tolerance of natural killer cells. *Nature Reviews Immunology* 6, 520–531 (2006).
26. Biassoni, R. Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands. *Current Protocols in Immunology Supplement* 84, Unit 14.10 (2009).
27. Raullet, D.H., Vance, R.E. & McMahon, C.W. Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annual Review of Immunology* 19, 291–330 (2001).
28. Brown, D., Trowsdale, J. & Allen, R. The LILR family. Modulators of innate and adaptive immune pathways in health and disease. *Tissue Antigens* 64, 215–225 (2004).
29. Borrego, F. *et al.* The CD94/NKG2 family of receptors. From molecules and cells to clinical relevance. *Immunologic Research* 35, 263–278 (2006).
30. Raullet, D.H. *et al.* Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annual Review of Immunology* 31, 413–441 (2013).

31. Groth, A. *et al.* Mechanisms of tumor and viral immune escape from natural killer cell-mediated surveillance. *Journal of Innate Immunity* 3, 344–354 (2011).
32. Guerra, N. *et al.* NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 28, 571–580 (2008).
33. Halftbeck, G.G. *et al.* Enhanced in vivo growth of lymphoma tumors in the absence of the NK-activating receptor NKp46/NCR1. *Journal of Immunology* 182, 2221–2230 (2009).
34. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C. & Mandelboim, O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in Immunology* 34, 182–191 (2013).
35. Horton, N.C. & Mathew, P.A. NKp44 and Natural Cytotoxicity Receptors as Damage-Associated Molecular Pattern Recognition Receptors. *Frontiers in Immunology* 6, 31 (2015).
36. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 8, 34–47 (2008).
37. Mellor, J.D. *et al.* A critical review of the role of Fc γ receptor polymorphisms in the response to monoclonal antibodies in cancer. *Journal of Hematology & Oncology* 6, 1 (2013).
38. Vivier, E. & Ugolini, S. NK cells: receptors and functions. STEMCELL Technologies. Retrieved from <https://t1p.de/r6yv>, accessed 6 January 2020.
39. Orange, J.S. Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nature Reviews Immunology* 8, 713–725 (2008).
40. Voskoboinik, I., Whisstock, J.C. & Trapani, J.A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology* 15, 388–400 (2015).
41. Zamai, L. *et al.* Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity. Differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *Journal of Experimental Medicine* 188, 2375–2380 (1998).
42. Fauriat, C. *et al.* Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* 115, 2167–2176 (2010).
43. Morandi, B. *et al.* NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-γ secretion. *European Journal of Immunology* 36, 2394–2400 (2006).
44. Roda, J.M. *et al.* Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells. *Cancer Research* 66, 517–526 (2006).
45. Zarour, H. M. *et al.*, in: Kufe *et al.* (eds.). *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition (BC Decker, Toronto, 2003), Chapter 12: Categories of Tumor Antigens.
46. Coulie, P.G. *et al.* Tumour antigens recognized by T lymphocytes. At the core of cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer* 14, 135–146 (2014).
47. Iqbal, N. & Iqbal, N. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers. Overexpression and Therapeutic Implications. *Molecular Biology International* 2014, 852748 (2014).
48. King, C.R., Kraus, M.H. & Aaronson, S.A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 229, 974–976 (1985).
49. Lemmon, M.A. & Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 141, 1117–1134 (2010).
50. Baselga, J. & Swain, S.M. Novel anticancer targets. Revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nature Reviews Cancer* 9, 463–475 (2009).
51. Maruyama, I.N. Mechanisms of activation of receptor tyrosine kinases. Monomers or dimers. *Cells* 3, 304–330 (2014).
52. Olayioye, M.A. *et al.* The ErbB signaling network. Receptor heterodimerization in development and cancer. *The EMBO journal* 19, 3159–3167 (2000).
53. Yarden, Y. & Sliwkowski, M.X. Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2, 127–137 (2001).
54. Coussens, L. *et al.* Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 230, 1132–1139 (1985).
55. Rubin, I. & Yarden, Y. The basic biology of HER2. *Annals of Oncology* 12 Suppl 1, S3-8 (2001).
56. Furrer, D. *et al.* The Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Prognostic and Predictive Biomarker. Molecular Insights into HER2 Activation and Diagnostic Implications, in: Lemamy (ed.), *Cancer prognosis*, (IntechOpen, London, 2018).
57. Slamon, D.J. *et al.* Human breast cancer. Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177–182 (1987).
58. Sarup, J.C. *et al.* Characterization of an anti-p185HER2 monoclonal antibody that stimulates receptor function and inhibits tumor cell growth. *Growth Regulation* 1, 72–82 (1991).
59. Shepard, H.M. *et al.* Monoclonal antibody therapy of human cancer. Taking the HER2 protooncogene to the clinic. *Journal of Clinical Immunology* 11, 117–127 (1991).
60. Carter, P. *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 4285–4289 (1992).

61. Li, J.J. & Corey, E.J. *Drug discovery. Practices, processes, and perspectives* (John Wiley & Sons, New York, 2013).
62. Magdelaine-Beuzelin, C. *et al.* Structure-function relationships of the variable domains of monoclonal antibodies approved for cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 64, 210–225 (2007).
63. Cho, H.-S. *et al.* Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756–760 (2003).
64. Austin, C.D. *et al.* Endocytosis and sorting of ErbB2 and the site of action of cancer therapeutics trastuzumab and geldanamycin. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5268–5282 (2004).
65. Vu, T. & Claret, F.X. Trastuzumab. Updated mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Frontiers in Oncology* 2, 62 (2012).
66. Milella, M. *et al.* Trastuzumab down-regulates Bcl-2 expression and potentiates apoptosis induction by Bcl-2/Bcl-XL bispecific antisense oligonucleotides in HER-2 gene–amplified breast cancer cells. *Clinical Cancer Research* 10, 7747–7756 (2004).
67. Izumi, Y., Xu, L., Di Tomaso, E., Fukumura, D. & Jain, R.K. Tumour biology. Herceptin acts as an anti-angiogenic cocktail. *Nature* 416, 279–280 (2002).
68. Molina, M.A. *et al.* Trastuzumab (herceptin), a humanized anti-Her2 receptor monoclonal antibody, inhibits basal and activated Her2 ectodomain cleavage in breast cancer cells. *Cancer Research* 61, 4744–4749 (2001).
69. Liu, P.C.C. *et al.* Identification of ADAM10 as a major source of HER2 ectodomain shedase activity in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Cancer Biology & Therapy* 5, 657–664 (2006).
70. Perrier, A. *et al.* The extracellular domain of Her2 in serum as a biomarker of breast cancer. *Laboratory Investigation* 98, 696–707 (2018).
71. Arnould, L. *et al.* Trastuzumab-based treatment of HER2-positive breast cancer. An antibody-dependent cellular cytotoxicity mechanism? *British Journal of Cancer* 94, 259–267 (2006).
72. Musolino, A. *et al.* Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 26, 1789–1796 (2008).
73. Clynes, R.A. *et al.* Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature Medicine* 6, 443–446 (2000).
74. Weiner, G.J. Building better monoclonal antibody-based therapeutics. *Nature Reviews Cancer* 15, 361–370 (2015).
75. Slamon, D.J. *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *The New England Journal of Medicine* 344, 783–792 (2001).
76. Seidman, A. *et al.* Cardiac dysfunction in the trastuzumab clinical trials experience. *Journal of Clinical Oncology* 20, 1215–1221 (2002).
77. Ozcelik, C. *et al.* Conditional mutation of the ErbB2 (HER2) receptor in cardiomyocytes leads to dilated cardiomyopathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8880–8885 (2002).
78. Markman, T.M. & Markman, M. Cardio-Oncology. Mechanisms of cardiovascular toxicity. *F1000Research* 7, 113 (2018).
79. U.S. Food and Drug Administration (FDA). HERCEPTIN (trastuzumab) Label. Retrieved from <https://t1p.de/9sgg>, accessed January 6, 2020.
80. Wikipedia. Monoclonal antibody therapy. List of FDA-approved therapeutic antibodies. Retrieved from <https://t1p.de/ixpy>, accessed January 6, 2020.
81. Wöckel, A. & Kreienberg, R. Interdisziplinäre S3-Leitlinie „Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms“. *Gynäkologe* 51, 510–513 (2018).
82. Kampan, N.C. *et al.* Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer. *BioMed Research International* 2015, 413076 (2015).
83. Weaver, B.A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* 25, 2677–2681 (2014).
84. Wani, M.C. *et al.* Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society* 93, 2325–2327 (1971).
85. Schiff, P.B., Fant, J. & Horwitz, S.B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* 277, 665–667 (1979).
86. Müller-Esterl, W. *Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler*, 3rd Edition (Springer, Berlin, 2018).
87. Snyder, J.P. *et al.* The binding conformation of Taxol in beta-tubulin. A model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5312–5316 (2001).
88. Nogales, E. *et al.* High-resolution model of the microtubule. *Cell* 96, 79–88 (1999).
89. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Taxol (paclitaxel) injection label. Retrieved from <https://t1p.de/cotm>, accessed January 6, 2019.
90. Cassinelli, G. The roots of modern oncology. From discovery of new antitumor anthracyclines to their clinical use. *Tumori* 2016, 226–235 (2016).
91. Arcamone, F. Properties of antitumor anthracyclines and new developments in their application. Cain memorial award lecture. *Cancer Research* 45, 5995–5999 (1985).

92. Deweese, J.E. & Osheroff, N. The DNA cleavage reaction of topoisomerase II. Wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Research* 37, 738–748 (2009).
93. Beretta, G.L. & Zunino, F. Molecular mechanisms of anthracycline activity. *Topics in Current Chemistry* 283, 1–19 (2008).
94. Pang, B. *et al.* Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin. *Nature Communications* 4, 1908 (2013).
95. U.S. Food and Drug Administration (FDA). Epirubicin Hydrochloride for Injection. Retrieved from <https://t1p.de/4pps>, accessed January 6, 2020.
96. Chatterjee, K. *et al.* Doxorubicin cardiomyopathy. *Cardiology* 115, 155–162 (2010).
97. Zamorano, J. L. *et al.* 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. The Task Force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC). *European Heart Journal* 37, 2768–2801 (2016).
98. Kang, D.-H. *et al.* Significant impairment in immune recovery after cancer treatment. *Nursing Research* 58, 105–114 (2009).
99. Tsavaris, N. *et al.* Immune changes in patients with advanced breast cancer undergoing chemotherapy with taxanes. *British Journal of Cancer* 87, 21–27 (2002).
100. Wijayahadi, N. *et al.* Changes in cellular immunity during chemotherapy for primary breast cancer with anthracycline regimens. *Journal of Chemotherapy* 19, 716–723 (2007).
101. Vicari, A.P. *et al.* Paclitaxel reduces regulatory T cell numbers and inhibitory function and enhances the anti-tumor effects of the TLR9 agonist PF-3512676 in the mouse. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 58, 615–628 (2009).
102. Verhoven, B., Schlegel, R.A. & Williamson, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 182, 1597–1601 (1995).
103. Lauber, K. *et al.* Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell* 113, 717–730 (2003).
104. Fadok, V.A. *et al.* Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- β , PGE₂, and PAF. *The Journal of Clinical Investigation* 101, 890–898 (1998).
105. Casares, N. *et al.* Caspase-dependent immunogenicity of doxorubicin-induced tumor cell death. *The Journal of Experimental Medicine* 202, 1691–1701 (2005).
106. Zitvogel, L. *et al.* Immunological aspects of cancer chemotherapy. *Nature Reviews Immunology* 8, 59–73 (2008).
107. Kono, H. & Rock, K.L. How dying cells alert the immune system to danger. *Nature Reviews Immunology* 8, 279–289 (2008).
108. Green, D.R. *et al.* Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nature Reviews Immunology* 9, 353–363 (2009).
109. Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1 β -dependent adaptive immunity against tumors. *Nature Medicine* 15, 1170–1178 (2009).
110. Krysko, D.V. *et al.* Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* 12, 860–875 (2012).
111. López-Soto, A. *et al.* Immunosurveillance of Malignant Cells with Complex Karyotypes. *Trends in Cell Biology* 27, 880–884 (2017).
112. Senovilla, L. *et al.* An immunosurveillance mechanism controls cancer cell ploidy. *Science* 337, 1678–1684 (2012).
113. Acebes-Huerta, A. *et al.* Drug-induced hyperploidy stimulates an antitumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. *Oncoimmunology* 5, e1074378 (2016).
114. Santaguada, S. *et al.* Chromosome Mis-segregation Generates Cell-Cycle-Arrested Cells with Complex Karyotypes that Are Eliminated by the Immune System. *Developmental Cell* 41, 638–651.e5 (2017).
115. Lasfargues, E.Y., Coutinho, W.G. & Redfield, E.S. Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* 61, 967–978 (1978).
116. Brockhoff, G. *et al.* Epidermal growth factor receptor, c-erbB2 and c-erbB3 receptor interaction, and related cell cycle kinetics of SK-BR-3 and BT474 breast carcinoma cells. *Cytometry* 44, 338–348 (2001).
117. Subik, K. *et al.* The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer: Basic and Clinical Research* 4, 35–41 (2010).
118. Dai, X. *et al.* Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *Journal of Cancer* 8, 3131–3141 (2017).
119. Ginestier, C. *et al.* ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene* 26, 7163–7169 (2007).
120. Tanner, M. *et al.* Characterization of a novel cell line established from a patient with Herceptin-resistant breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 1585–1592 (2004).
121. Cailleau, R., Olivé, M. & Cruciger, Q.V. Long-term human breast carcinoma cell lines of metastatic origin. Preliminary characterization. *In vitro* 14, 911–915 (1978).

122. Kornbluth, J., Flomenberg, N. & Dupont, B. Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells. *Journal of Immunology* 129, 2831–2837 (1982).
123. Kornbluth, J., Spear, B., Raab, S.S. & Wilson, D.B. Evidence for the role of class I and class II HLA antigens in the lytic function of a cloned line of human natural killer cells. *Journal of Immunology* 134, 728–735 (1985).
124. Kornbluth, J. & Hoover, R.G. Changes in gene expression associated with IFN-beta and IL-2-induced augmentation of human natural killer cell function. *Journal of immunology* 141, 3234–3240 (1988).
125. BD Biosciences. BD FACSCanto Flow Cytometer Reference Manual. For In Vitro Diagnostic Use (2004). Retrieved from <https://t1p.de/4aw8>, accessed January 6, 2020.
126. Sack, U., Tárnok, A. & Rothe, G. (eds.), *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (S. Karger AG, Basel, 2007).
127. BD Biosciences. Retrieved from <https://t1p.de/hr3r>, accessed January 6, 2020.
128. BD Biosciences. Retrieved from <https://t1p.de/06s6>, accessed January 6, 2020.
129. BD Biosciences. Retrieved from <https://t1p.de/ry6o>, accessed January 6, 2020.
130. BD Biosciences. BD FACSCanto II Instructions For Use. For In Vitro Diagnostic Use (2007). Retrieved from <https://t1p.de/cp8a>, accessed January 6, 2020.
131. BD Biosciences. BD FACSCanto II Flow Cytometer. Filter Guide (2012). Retrieved from <https://t1p.de/0o1n>, accessed January 6, 2020.
132. Brockhoff, G. *DNA- und Proliferationsmessungen in der Durchflusszytometrie*, in: *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*, Sack, U., Tárnok, A. & Rothe, G. (eds.), *Zelluläre Diagnostik, Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie* (S. Karger AG, Basel, 2007), pp. 604–646.
133. Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods* 184, 39–51 (1995).
134. Vossen, M. T. M. *et al.* CD27 Defines Phenotypically and Functionally Different Human NK Cell Subsets. *Journal of Immunology* 180, 3739–3745 (2008).
135. Fu, B. *et al.* CD11b and CD27 reflect distinct population and functional specialization in human natural killer cells. *Immunology* 133, 350–359 (2011).
136. Melero, I. *et al.* NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cellular immunology* 190, 167–172 (1998).
137. Wilcox, R.A., Tamada, K., Strome, S.E. & Chen, L. Signaling through NK cell-associated CD137 promotes both helper function for CD8+ cytolytic T cells and responsiveness to IL-2 but not cytolytic activity. *Journal of Immunology* 169, 4230–4236 (2002).
138. Baessler, T. *et al.* CD137 ligand mediates opposite effects in human and mouse NK cells and impairs NK-cell reactivity against human acute myeloid leukemia cells. *Blood* 115, 3058–3069 (2010).
139. Vidard, L. *et al.* CD137 (4-1BB) Engagement Fine-Tunes Synergistic IL-15- and IL-21-Driven NK Cell Proliferation. *Journal of Immunology* 203, 676–685 (2019).
140. STEMCELL Technologies. Retrieved from <https://t1p.de/mgng>, accessed January 6, 2020.
141. Luttmann, W. *Der Experimentator. Immunologie*. 4th edition (Springer, Berlin, 2014).
142. Miltenyi Biotec. Retrieved from <https://t1p.de/zwro>, accessed January 6, 2020.
143. Diermeier-Daucher, S. *et al.* Modular anti-EGFR and anti-Her2 targeting of SK-BR-3 and BT474 breast cancer cell lines in the presence of ErbB receptor-specific growth factors. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology* 79, 684–693 (2011).
144. Mohsin, S.K. *et al.* Neoadjuvant trastuzumab induces apoptosis in primary breast cancers. *Journal of Clinical Oncology* 23, 2460–2468 (2005).
145. Pegram, M.D. *et al.* Rational Combinations of Trastuzumab With Chemotherapeutic Drugs Used in the Treatment of Breast Cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 96, 739–749 (2004).
146. Baselga, J. *et al.* Recombinant humanized anti-HER2 antibody (Herceptin) enhances the antitumor activity of paclitaxel and doxorubicin against HER2/neu overexpressing human breast cancer xenografts. *Cancer Research* 58, 2825–2831 (1998).
147. Pegram, M. *et al.* Inhibitory effects of combinations of HER-2/neu antibody and chemotherapeutic agents used for treatment of human breast cancers. *Oncogene* 18, 2241–2251 (1999).
148. Lee, S. *et al.* Enhanced sensitization to taxol-induced apoptosis by herceptin pretreatment in ErbB2-overexpressing breast cancer cells. *Cancer Research* 62, 5703–5710 (2002).
149. Henson, E.S., Hu, X. & Gibson, S.B. Herceptin sensitizes ErbB2-overexpressing cells to apoptosis by reducing antiapoptotic Mcl-1 expression. *Clinical Cancer Research* 12, 845–853 (2006).
150. Qian, Y.-X., Yu, R. & Qin, S.-R. Paclitaxel and trastuzumab treatment affects insulin growth factor I expression in breast cancer cell lines. *Bangladesh Journal of Pharmacology* 10, 799 (2015).

151. Mantovani, A. *et al.* Effect of chemotherapeutic agents on natural cell-mediated cytotoxicity in mice. *Journal of the National Cancer Institute* 61, 1255–1261 (1978).
152. Markasz, L. *et al.* Effect of frequently used chemotherapeutic drugs on the cytotoxic activity of human natural killer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 6, 644–654 (2007).
153. Carson, W.E. *et al.* Cellular immunity in breast cancer patients completing taxane treatment. *Clinical Cancer Research* 10, 3401–3409 (2004).
154. Sako, T. *et al.* Cellular immune profile in patients with non-small cell lung cancer after weekly paclitaxel therapy. *Acta Oncologica* 43, 15–19 (2004).
155. Kubo, M. *et al.* Paclitaxel probably enhances cytotoxicity of natural killer cells against breast carcinoma cells by increasing perforin production. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 54, 468–476 (2005).
156. Verma, C. *et al.* Natural killer (NK) cell profiles in blood and tumour in women with large and locally advanced breast cancer (LLABC) and their contribution to a pathological complete response (PCR) in the tumour following neoadjuvant chemotherapy (NAC). Differential restoration of blood profiles by NAC and surgery. *Journal of Translational Medicine* 13, 180 (2015).
157. Cooley, S. *et al.* Natural killer cell cytotoxicity of breast cancer targets is enhanced by two distinct mechanisms of antibody-dependent cellular cytotoxicity against LFA-3 and HER2/neu. *Experimental Hematology* 27, 1533–1541 (1999).
158. Barok, M. *et al.* Trastuzumab causes antibody-dependent cellular cytotoxicity-mediated growth inhibition of submacroscopic JIMT-1 breast cancer xenografts despite intrinsic drug resistance. *Molecular cancer therapeutics* 6, 2065–2072 (2007).
159. Kute, T. *et al.* Understanding key assay parameters that affect measurements of trastuzumab-mediated ADCC against Her2 positive breast cancer cells. *Oncoimmunology* 1, 810–821 (2012).
160. Larsen, S.K., Gao, Y. & Basse, P.H. NK cells in the tumor microenvironment. *Critical Reviews in Oncogenesis* 19, 91–105 (2014).
161. Plosker, G.L. & Faulds, D. Epirubicin. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in cancer chemotherapy. *Drugs* 45, 788–856 (1993).
162. Rozanov, D.V. *et al.* MHC class I loaded ligands from breast cancer cell lines. A potential HLA-I-typed antigen collection. *Journal of Proteomics* 176, 13–23 (2018).
163. Ruggeri, L. *et al.* Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* 295, 2097–2100 (2002).
164. Trompeter, H.-I. *et al.* Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors (KIR), of KIR2DL4, and of KIR3DL3. *Journal of Immunology* 174, 4135–4143 (2005).
165. Vilches, C. & Parham, P. KIR. Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annual Review of Immunology* 20, 217–251 (2002).
166. Lefebvre, S. *et al.* Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *The Journal of Pathology* 196, 266–274 (2002).
167. Nagy, P. *et al.* Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Research* 65, 473–482 (2005).
168. Komatsu, M., Yee, L. & Carraway, K.L. Overexpression of sialomucin complex, a rat homologue of MUC4, inhibits tumor killing by lymphokine-activated killer cells. *Cancer Research* 59, 2229–2236 (1999).
169. Lesniak, D. *et al.* Spontaneous epithelial-mesenchymal transition and resistance to HER-2-targeted therapies in HER-2-positive luminal breast cancer. *PloS one* 8, e71987 (2013).
170. Aoudjit, F. & Vuori, K. Integrin signaling inhibits paclitaxel-induced apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 20, 4995–5004 (2001).
171. Azambuja, E. *et al.* HER-2 overexpression/amplification and its interaction with taxane-based therapy in breast cancer. *Annals of Oncology* 19, 223–232 (2008).
172. Haghnavaz, N. *et al.* HER2 positivity may confer resistance to therapy with paclitaxel in breast cancer cell lines. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology* 46, 518–523 (2018).
173. Becker, P.S.A. *et al.* Selection and expansion of natural killer cells for NK cell-based immunotherapy. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 65, 477–484 (2016).
174. Sarvaria, A. *et al.* Umbilical Cord Blood Natural Killer Cells, Their Characteristics, and Potential Clinical Applications. *Frontiers in Immunology* 8, 329 (2017).
175. Balassa, K. & Rocha, V. Anticancer cellular immunotherapies derived from umbilical cord blood. *Expert Opinion on Biological Therapy* 18, 121–134 (2018).
176. Silva, A. *et al.* Application of CD27 as a marker for distinguishing human NK cell subsets. *International Immunology* 20, 625–630 (2008).
177. Shiloh, Y. ATM and related protein kinases. Safeguarding genome integrity. *Nature reviews. Cancer* 3, 155–168 (2003).

178. Gasser, S. *et al.* The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186–1190 (2005).
179. Soriani, A. *et al.* Reactive oxygen species- and DNA damage response-dependent NK cell activating ligand upregulation occurs at transcriptional levels and requires the transcriptional factor E2F1. *Journal of Immunology* 193, 950–960 (2014).
180. Soriani, A. *et al.* ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 113, 3503–3511 (2009).
181. Di Modica, M. *et al.* Taxanes enhance trastuzumab-mediated ADCC on tumor cells through NKG2D-mediated NK cell recognition. *Oncotarget* 7, 255–265 (2016).
182. Ullrich, E. *et al.* Tumor stress, cell death and the ensuing immune response. *Cell Death and Differentiation* 15, 21–28 (2008).
183. Zingoni, A. *et al.* Natural Killer Cell Response to Chemotherapy-Stressed Cancer Cells. Role in Tumor Immunosurveillance. *Frontiers in immunology* 8, 1194 (2017).
184. Lee, L.F. *et al.* Taxol-dependent transcriptional activation of IL-8 expression in a subset of human ovarian cancer. *Cancer Research* 56, 1303–1308 (1996).
185. Lee, L.F. *et al.* IL-8 reduced tumorigenicity of human ovarian cancer in vivo due to neutrophil infiltration. *Journal of Immunology* 164, 2769–2775 (2000).
186. Wen, J. *et al.* Antileukemic drugs increase death receptor 5 levels and enhance Apo-2L-induced apoptosis of human acute leukemia cells. *Blood* 96, 3900–3906 (2000).
187. Guan, B. *et al.* Evidence that the death receptor DR4 is a DNA damage-inducible, p53-regulated gene. *Journal of Cellular Physiology* 188, 98–105 (2001).
188. Müller, M. *et al.* p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *Journal of Experimental Medicine* 188, 2033–2045 (1998).
189. Feng, H. *et al.* Epirubicin pretreatment enhances NK cell-mediated cytotoxicity against breast cancer cells in vitro. *American Journal of Translational Research* 8, 473–484 (2016).
190. White, C. M. *et al.* Effects of paclitaxel on cytokine synthesis by unprimed human monocytes, T lymphocytes, and breast cancer cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 46, 104–112 (1998).
191. Wasinger, V.C. *et al.* Progress with gene-product mapping of the Mollicutes. *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090–1094 (1995).
192. Rehm, H. & Letzel, T. *Proteinbiochemie/Proteomics*. 6th edition (Springer, Heidelberg, 2010).
193. Carlin, L.M. *et al.* Intercellular transfer and supramolecular organization of human leukocyte antigen C at inhibitory natural killer cell immune synapses. *Journal of Experimental Medicine* 194, 1507–1517 (2001).
194. Roda-Navarro, P. *et al.* Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 11258–11263 (2006).
195. Evans, J.H. *et al.* A distinct subset of human NK cells expressing HLA-DR expand in response to IL-2 and can aid immune responses to BCG. *European Journal of Immunology* 41, 1924–1933 (2011).
196. Roncarolo, M.G. *et al.* Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *Journal of Immunology* 147, 781–787 (1991).
197. Burt, B.M. *et al.* Circulating HLA-DR(+) natural killer cells have potent lytic ability and weak antigen-presenting cell function. *Human immunology* 69, 469–474 (2008).
198. Hanna, J. *et al.* Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation. *The Journal of Clinical Investigation* 114, 1612–1623 (2004).
199. Hanna, J. & Mandelboim, O. When killers become helpers. *Trends in Immunology* 28, 201–206 (2007).
200. Kambayashi, T. & Laufer, T.M. Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells. Can anything replace a dendritic cell? *Nature Reviews Immunology* 14, 719–730 (2014).
201. Chen, L. & Flies, D.B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nature Reviews Immunology* 13, 227–242 (2013).
202. Hanna, J. *et al.* Proteomic analysis of human natural killer cells. Insights on new potential NK immune functions. *Molecular Immunology* 42, 425–431 (2005).
203. Loyon, R. *et al.* IL-21-Induced MHC Class II+ NK Cells Promote the Expansion of Human Uncommitted CD4+ Central Memory T Cells in a Macrophage Migration Inhibitory Factor-Dependent Manner. *Journal of Immunology* 197, 85–96 (2016).
204. Chaput, N. *et al.* Phase I clinical trial combining imatinib mesylate and IL-2. HLA-DR+ NK cell levels correlate with disease outcome. *Oncoimmunology* 2, e23080 (2013).
205. Nikzad, R. *et al.* Human natural killer cells mediate adaptive immunity to viral antigens. *Science Immunology* 4 (2019).
206. Tonks, N.K. *et al.* Demonstration that the leukocyte common antigen CD45 is a protein tyrosine phosphatase. *Biochemistry* 27, 8695–8701 (1988).

207. Penninger, J.M. *et al.* CD45. New jobs for an old acquaintance. *Nature Immunology* 2, 389–396 (2001).
208. Fu, X. *et al.* Human natural killer cells expressing the memory-associated marker CD45RO from tuberculous pleurisy respond more strongly and rapidly than CD45RO- natural killer cells following stimulation with interleukin-12. *Immunology* 134, 41–49 (2011).
209. Krzywinska, E. *et al.* Identification of Anti-tumor Cells Carrying Natural Killer (NK) Cell Antigens in Patients With Hematological Cancers. *EBioMedicine* 2, 1364–1376 (2015).
210. Krzywinska, E. *et al.* CD45 Isoform Profile Identifies Natural Killer (NK) Subsets with Differential Activity. *PLoS one* 11, e0150434 (2016).
211. Saunders, A.E. & Johnson, P. Modulation of immune cell signalling by the leukocyte common tyrosine phosphatase, CD45. *Cellular signalling* 22, 339–348 (2010).
212. Yamada, H. *et al.* Enhanced generation of NK cells with intact cytotoxic function in CD45 exon 6-deficient mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 157, 1523–1528 (1996).
213. Huntington, N. D. *et al.* A requirement for CD45 distinguishes Ly49D-mediated cytokine and chemokine production from killing in primary natural killer cells. *Journal of Experimental Medicine* 201, 1421–1433 (2005).
214. Hesslein, D. G. T. *et al.* Dysregulation of signaling pathways in CD45-deficient NK cells leads to differentially regulated cytotoxicity and cytokine production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 7012–7017 (2006).
215. Kondo, M., Weissman, I.L. & Akashi, K. Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661–672 (1997).
216. Chen, Q. *et al.* Delineation of Natural Killer Cell Differentiation from Myeloid Progenitors in Human. *Scientific Reports* 5, 15118 (2015).
217. Sun, J.C. & Lanier, L.L. NK cell development, homeostasis and function. Parallels with CD8⁺ T cells. *Nature Reviews Immunology* 11, 645–657 (2011).
218. Yu, J., Freud, A.G. & Caligiuri, M.A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends in Immunology* 34, 573–582 (2013).
219. Caligiuri, M. A. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469 (2008).
220. Radin, D.P. & Patel, P. BDNF. An Oncogene or Tumor Suppressor? *Anticancer Research* 37, 3983–3990 (2017).
221. Jaboin, J. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor activation of TrkB protects neuroblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis via phosphatidylinositol 3'-kinase pathway. *Cancer Research* 62, 6756–6763 (2002).
222. Patani, N., Jiang, W.G. & Mokbel, K. Brain-derived neurotrophic factor expression predicts adverse pathological & clinical outcomes in human breast cancer. *Cancer Cell International* 11, 23 (2011).
223. Vanhecke, E. *et al.* Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clinical Cancer Research* 17, 1741–1752 (2011).
224. Tsai, C.-H. *et al.* Molecular characteristics of recurrent triple-negative breast cancer. *Molecular Medicine Reports* 12, 7326–7334 (2015).
225. Choy, C. *et al.* Cooperation of neurotrophin receptor TrkB and Her2 in breast cancer cells facilitates brain metastases. *Breast Cancer Research* 19, 51 (2017).
226. Luque-Cabal, M. *et al.* Mechanisms Behind the Resistance to Trastuzumab in HER2-Amplified Breast Cancer and Strategies to Overcome It. *Clinical Medicine Insights. Oncology* 10, 21–30 (2016).
227. Hammarberg, H. *et al.* Neuroprotection by encephalomyelitis. Rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *The Journal of Neuroscience* 20, 5283–5291 (2000).
228. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology* 5, 442 (2014).
229. Raposo, G. & Stoorvogel, W. Extracellular vesicles. Exosomes, microvesicles, and friends. *The Journal of Cell Biology* 200, 373–383 (2013).
230. Kalra, H., Drummen, G.P.C. & Mathivanan, S. Focus on Extracellular Vesicles. Introducing the Next Small Big Thing. *International Journal of Molecular Sciences* 17, 170 (2016).
231. Johnstone, R.M. Exosomes biological significance. A concise review. *Blood Cells, Molecules & Diseases* 36, 315–321 (2006).
232. Babst, M. MVB vesicle formation. ESCRT-dependent, ESCRT-independent and everything in between. *Current Opinion in Cell Biology* 23, 452–457 (2011).
233. Simons, M. & Raposo, G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology* 21, 575–581 (2009).
234. Lugini, L. *et al.* Immune surveillance properties of human NK cell-derived exosomes. *Journal of Immunology* 189, 2833–2842 (2012).
235. Zhu, L. *et al.* Exosomes Derived From Natural Killer Cells Exert Therapeutic Effect in Melanoma. *Theranostics* 7, 2732–2745 (2017).

236. Zhu, L. *et al.* Targeting and Therapy of Glioblastoma in a Mouse Model Using Exosomes Derived From Natural Killer Cells. *Frontiers in Immunology* 9, 824 (2018).
237. Roda-Navarro, P. & Reyburn, H.T. The traffic of the NKG2D/Dap10 receptor complex during natural killer (NK) cell activation. *The Journal of Biological Chemistry* 284, 16463–16472 (2009).
238. Lee, J. *et al.* Fas Ligand localizes to intraluminal vesicles within NK cell cytolytic granules and is enriched at the immune synapse. *Immunity, Inflammation and Disease* 6, 312–321 (2018).
239. Krämer, B. *et al.* Regulation of NK cell trafficking by CD81. *European Journal of Immunology* 39, 3447–3458 (2009).
240. Garcia-Zepeda, E.A. *et al.* Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nature Medicine* 2, 449–456 (1996).
241. Kitaura, M. *et al.* Molecular cloning of human eotaxin, an eosinophil-selective CC chemokine, and identification of a specific eosinophil eotaxin receptor, CC chemokine receptor 3. *The Journal of Biological Chemistry* 271, 7725–7730 (1996).
242. Reichman, H., Karo-Atar, D. & Munitz, A. Emerging Roles for Eosinophils in the Tumor Microenvironment. *Trends in Cancer* 2, 664–675 (2016).
243. Davis, B.P. & Rothenberg, M.E. Eosinophils and cancer. *Cancer Immunology Research* 2, 1–8 (2014).
244. Sakkal, S. *et al.* Eosinophils in Cancer. Favourable or Unfavourable? *Current Medicinal Chemistry* 23, 650–666 (2016).
245. Simon, S.C.S., Utikal, J. & Umansky, V. Opposing roles of eosinophils in cancer. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 68, 823–833 (2019).
246. Carretero, R. *et al.* Eosinophils orchestrate cancer rejection by normalizing tumor vessels and enhancing infiltration of CD8(+) T cells. *Nature Immunology* 16, 609–617 (2015).
247. Gündüz, S. *et al.* Factors affecting disease-free survival in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer who receive adjuvant trastuzumab. *Molecular and Clinical Oncology* 3, 1109–1112 (2015).
248. Martinon, F., Burns, K. & Tschopp, J. The inflammasome. A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Molecular Cell* 10, 417–426 (2002).
249. Lopez-Castejon, G. & Brough, D. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 22, 189–195 (2011).
250. Sauter, K. A. D. *et al.* Doxorubicin and daunorubicin induce processing and release of interleukin-1 β through activation of the NLRP3 inflammasome. *Cancer Biology & Therapy* 11, 1008–1016 (2011).
251. Sanctis, J. B. de, Blanca, I. & Bianco, N. E. Secretion of cytokines by natural killer cells primed with interleukin-2 and stimulated with different lipoproteins. *Immunology* 90, 526–533 (1997).
252. Kroemer, G. *et al.* Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annual Review of Immunology* 31, 51–72 (2013).
253. Hunter, C.A., Chizzonite, R. & Remington, J.S. IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens. *Journal of Immunology* 155, 4347–4354 (1995).
254. Cooper, M.A. *et al.* Interleukin-1beta costimulates interferon-gamma production by human natural killer cells. *European Journal of Immunology* 31, 792–801 (2001).
255. Apte, R.N. *et al.* The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Reviews* 25, 387–408 (2006).
256. Lewis, A.M. *et al.* Interleukin-1 and cancer progression. The emerging role of interleukin-1 receptor antagonist as a novel therapeutic agent in cancer treatment. *Journal of Translational Medicine* 4, 48 (2006).
257. Wu, T.-C. *et al.* IL1 Receptor Antagonist Controls Transcriptional Signature of Inflammation in Patients with Metastatic Breast Cancer. *Cancer Research* 78, 5243–5258 (2018).
258. Terstappen, L. W. *et al.* Differentiation and maturation of growth factor expanded human hematopoietic progenitors assessed by multidimensional flow cytometry. *Leukemia* 6, 1001–1010 (1992).
259. Tao, W. *et al.* Comparative proteomic analysis of human CD34+ stem/progenitor cells and mature CD15+ myeloid cells. *Stem Cells* 22, 1003–1014 (2004).
260. Gadhoun, S.Z. & Sackstein, R. CD15 expression in human myeloid cell differentiation is regulated by sialidase activity. *Nature Chemical Biology* 4, 751–757 (2008).
261. Ohmori, K. *et al.* Sialyl SSEA-1 antigen as a carbohydrate marker of human natural killer cells and immature lymphoid cells. *Blood* 74, 255–261 (1989).
262. Ball, E.D., Schwarz, L.M. & Bloomfield, C.D. Expression of the CD15 antigen on normal and leukemic myeloid cells. Effects of neuraminidase and variable detection with a panel of monoclonal antibodies. *Molecular Immunology* 28, 951–958 (1991).
263. Grzywacz, B. *et al.* Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 117, 3548–3558 (2011).
264. Nakayama, F. *et al.* CD15 expression in mature granulocytes is determined by alpha 1,3-fucosyltransferase IX, but in promyelocytes and monocytes by alpha 1,3-fucosyltransferase IV. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 16100–16106 (2001).

265. Tabiasco, J. *et al.* Acquisition of Viral Receptor by NK Cells Through Immunological Synapse. *Journal of Immunology* 170, 5993–5998 (2003).
266. Liu, C.-F. *et al.* Complement Receptor 3 Has Negative Impact on Tumor Surveillance through Suppression of Natural Killer Cell Function. *Frontiers in Immunology* 8, 1602 (2017).
267. Min, X. *et al.* Expression and regulation of complement receptors by human natural killer cells. *Immunobiology* 219, 671–679 (2014).
268. Reis, E.S., Mastellos, D.C., Ricklin, D., Mantovani, A. & Lambris, J.D. Complement in cancer. Untangling an intricate relationship. *Nature Reviews Immunology* 18, 5–18 (2018).

Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Anja-Kathrin Wege und Herrn Prof. Dr. Gero Brockhoff für die anregende Themenstellung und die hervorragende Betreuung bedanken – v. a. für ihre prompte Antwort auf Fragen aller Art und ihren immer kompetenten Rat.

Mein Dank gilt aber auch allen anderen Mitarbeiter*innen der Arbeitsgruppe, die mich in meinem Promotionsprojekt unterstützt haben: Frau Marietta Bock für ihre fundierte Einführung in die Techniken und ihre stete Hilfestellung bei der in-vitro-Zellkultur, Frau Teresa Leist für ihre qualifizierte Anleitung im Umgang mit den ex-vivo-Zellkulturen und zu guter Letzt Herrn Gerhard Piendl für seine fortlaufende Hilfe bei Problemen aller Art, v. a. auch am Durchflusszytometer. Auch die angenehme Arbeitsatmosphäre und die anregenden Arbeitsgruppenmeetings haben zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen.

Der Fakultät für Medizin der Universität Regensburg danke ich ferner für das Promotionsstipendium, das es mir ermöglichte, mich für die Dauer eines Semesters ausschließlich auf die experimentelle Arbeit zu konzentrieren. Wertvolle Unterstützung habe ich außerdem durch ImmunoTools erhalten, die mit dem ImmunoTools multiplex Award die Durchführung der Sciomics-Experimente ermöglicht haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt schließlich meiner Mutter Brigitte, meiner Schwester Ina und Kilian, die mich mit unermüdlicher Geduld und Unterstützung durch meine Studien- und Promotionszeit begleitet haben.