



TUM School of Medicine and Health

Untersuchungen zur Bedeutung von CX3CL1 für die NK-Zell-vermittelte Lyse von Mammakarzinomzellen

Nadine Heithorst

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Medicine and Health der Technischen Universität München zur Erlangung einer Doktorin der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gabriele Multhoff

Prüfende der Dissertation: 1. Prof. Dr. Marion B. Kiechle
2. Priv.-Doz. Dr. Judith Hecker

Die Dissertation wurde am 15.07.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Medicine and Health am 05.02.2025 angenommen.

Technische Universität München

Klinikum Rechts der Isar

Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde

Untersuchungen zur Bedeutung von CX3CL1 für die NK-Zell-
vermittelte Lyse von Mammakarzinomzellen

Nadine Heithorst

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	3
2 Abbildungsverzeichnis	5
4 Abkürzungsverzeichnis	7
5 Zusammenfassung	9
7 Einleitung	10
7.1 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms	10
7.2 Diagnostik	10
7.3 Pathologie	11
7.4 Therapie	13
7.5 Bedeutung immunologischer Prozesse für die Tumorentwicklung	15
7.6 Chemokine in der Tumorimmunologie	18
8 Zielsetzung und Grundhypothese	22
9 Material	23
9.1 Zellkultur	23
9.2 ELISA	23
9.3 Western Blot	24
9.4 EU ASSAY	25
9.5 Transfektion	25
10 Methoden	26
10.1 Zelllinien	26
10.1.1 Subkultivierungsprotokolle	26
10.1.2 Zellzählung	27
10.1.3 Stimulation der Zellen	28
10.1.4 Einfrieren der Zellen	29
10.1.5 Auftauen der Zellen	29
10.2 ELISA	29
10.2.1 Herstellung des Standards als Messgrundlage des ELISA	30
10.2.2 Herstellung des Waschpuffer für den ELISA	30
10.3 Western Blot	30
10.3.1 Herstellung des Wet-Blotting Puffers	34
10.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellproben für den Westernblot	34
10.3.3 Herstellung des Lysepuffer für die Proteingewinnung	35
10.3.4 Herstellung der Wet-Blotting-Gele	35

10.4 EU Assay	36
10.4.1 Stimulation der Zellen für den EU-Assay	37
10.4.2 Stimulation der NK-Zellen für den EU-ASSAY	38
10.4.3 Transfektion der Zellen	38
11 Ergebnisse	39
11.1 Detektion des löslichen CX3CL1 mittels ELISA.....	39
11.2 Detektion des zellulären CX3CL1 mittels Westernblot	42
11.3 CX3CL1 verstärkt die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität HER2-positiver Tumorzellen	44
12 Diskussion	47
12.1 Charakteristika der CX3CL1-Expression.....	47
12.3 Schlussfolgerung und Ausblick.....	51
13 Danksagung.....	53
14 Literaturverzeichnis.....	54
15 Eidesstattliche Erklärung.....	59

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick HER2-gerichteter Therapien.	14
Abbildung 2: Auswahl an Mechanismen der Aktivität von B-, T-, sowie NK-Zellen.	17
Abbildung 3: Signalwege von TNF- α und IFN- γ	18
Abbildung 4: Rolle der CX3CL1-CXC3R1-Achse in der anti-Tumor-Funktion von NK-Zellen.	20
Abbildung 5: Einfluss von CX3CL1 auf die Tumorentwicklung	21
Abbildung 6: Neubauer-Zählkammer.	27
Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer (Seitansicht).	27
Abbildung 8: Wet/Tank Blotting-System.	31
Abbildung 9: Aufbau der Schichtung zum Proteinübertrag auf die Western-Blot-Membran.	32
Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablauf eines Westernblot.	33
Abbildung 11: Detektion des löslichen CX3CL1 bzw. CXCL10 mittels ELISA in MDA-MB-453. ...	40
Abbildung 12: Detektion des löslichen CX3CL1 bzw. CXCL10 mittels ELISA in BT-474.	41
Abbildung 13: Darstellung des zellulären CX3CL1 der Zelllinie MDA-MB-453.	43
Abbildung 14: Darstellung des zellulären CX3CL1 der Zelllinie BT-474.	43
Abbildung 15: Europium-Lyse-Assay der Zelllinie MDA-MB-453.	45
Abbildung 16: Europium-Lyse-Assay der BT 474 Zellen.	46

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung eines Mammakarzinoms nach der TNM-Klassifikation.	11
Tabelle 2: Empfehlungen der ASCO zur Einstufung HER2 getesteter Karzinome.	13
Tabelle 3: Verwendete Materialien in der Zellkultur	23
Tabelle 4: Verwendete Materialien für den ELISA.....	23
Tabelle 5: Verwendete Materialien für den Westernblot	24
Tabelle 6: Verwendete Materialien für den EU-Assay	25
Tabelle 7: Verwendete Materialien für die Transfektion	25
Tabelle 8: Verwendete Medien der einzelnen Zelllinien.....	26
Tabelle 9: Vorverdünnungen der Stimulanzen.....	28
Tabelle 10 : Zusammensetzung des ELISA Waschpuffer.....	30
Tabelle 11 : Zusammensetzung des Wet-Blotting-Puffers.....	34
Tabelle 12 : Zusammensetzung des Lysepuffer	35
Tabelle 13 : Zusammensetzung des Trenngels.....	35
Tabelle 14 : Zusammensetzung des Sammelgels	36
Tabelle 15: Verdünnung der Stimulanzen EU-Assay	38

4 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase (Disintegrin-Metalloproteinasen)
ADCC	Antibody-Dependet Cellular Cytotoxicity (Antikörper-Abhängige Zelluläre Zytotoxizität)
ADC	Antibody-Drug Conjugates (Antikörper-Wirkstoff-Konjugate)
BSA	Bovine Serum Albumin (Bovines Serumalbumin)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EU-Assay	Europium Assay
FCS	Fetal Calf Serum (Fetales Kälberserum)
GAM	Gifu Anaerobic Medium (Gifu Anaerobes Medium)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HER2	Human Epidermal Growth Factor 2 (Humaner Epidermaler Wachstumsfaktor 2)
IFN- γ	Interferon-Gamma
NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PARP	Poly(AdenosinDiPhosphat-Ribose)-Polymerasen
TNF- α	Tumornekrosefaktor-Alpha
TAPI-2	TNF Protease Inhibitor 2
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
RPM	Rounds Per Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

TBST	Tris-Buffered Saline With Tween20
TNM	Tumor Node Metastasis
UICC	Union Internationale Contre Le Cancer

5 Zusammenfassung

Das angeborene Immunsystem ist in der Lage Tumorzellwachstum zu unterbinden. Insbesondere natürliche Killerzellen gehören zu den wichtigsten tumorsuppressiven Lymphozytenpopulationen. Sie spielen darüber hinaus eine wesentliche Rolle als Vermittler der antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), etwa bei der HER2-Therapie des Mammakarzinoms mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab. Dennoch zeigen viele auch HER2-positive Mammakarzinomzellen Resistenzen gegen diese Therapien.

Das Chemokin CX3CL1 ist neben der Fähigkeit, natürliche Killerzellen chemotaktisch zu rekrutieren, auch an der Vermittlung deren Adhäsion beteiligt. CX3CL1 existiert sowohl als lösliche als auch membranständige Form. Es wird insbesondere unter dem Einfluss inflammatorischer Zytokine, wie $\text{TNF-}\alpha$ oder $\text{IFN-}\gamma$, auch in Mammakarzinomzellen induziert.

Es ist anzunehmen, dass eine Überexpression von CX3CL1 die NK-Zell-vermittelte Lyse von Mammakarzinomzellen, insbesondere die HER2-positiver Karzinome, in Kombination mit der anti-HER2-Therapie durch Trastuzumab verbessern kann. Der Grad der funktionalen Unterstützung insbesondere des zellulären CX3CL1 in der Zelllyse ist durch weitere Untersuchungen herauszustellen.

In dieser Arbeit wurde zunächst das Expressionsmuster von CX3CL1 in zwei unterschiedlichen HER2-positiven Mammakarzinomzellen charakterisiert. Im anschließenden Zelllyse-Assay wurde ein Zusammenhang zwischen CX3CL1-Proteinexpression und NK-Zell-vermittelten Lyse der Tumorzellen untersucht. Dabei zeigte sich eine verbesserte Lyse der Mammakarzinomzellen durch NK-Zellen in Abhängigkeit von der CX3CL1-Expression in den Tumorzellen.

7 Einleitung

7.1 Epidemiologie und Ätiologie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau. Das Lebenszeitrisko beträgt etwa 12%, das mediane Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren. Männer dagegen erkranken deutlich seltener. Derzeit stellt das Mammakarzinom die häufigste Krebstodesursache von Frauen weltweit dar (Maes-Carballo et al. 2020).

Heute sind einige Faktoren bekannt, die das Risiko einer Erkrankung am Mammakarzinom erhöhen. Neben den allgemeinen Risiken, die zu einer Karzinomerkkrankung führen können, wie ein hohes Lebensalter oder toxische Einflüsse (z.B. Alkoholkonsum oder Nikotinabusus), gelten für das Mammakarzinom auch spezifische Risikofaktoren. Hierzu zählen endokrine Faktoren, zum Beispiel ein langer hormonell aktiver Zeitraum, Adipositas oder hormonelle Kontrazeption, aber auch eine Hormonersatztherapie während der Menopause erhöht die Inzidenz der Erkrankung (Rojas et al. 2016; Mørch et al. 2017). Mind. 5-10% aller Mammakarzinom-Neuerkrankungen sind genetisch bedingt. Das genetische Risiko hängt hierbei insbesondere von Keimbahnmutationen in DNA-Reparaturproteinen ab. Mutationen der BRCA1/2-Gene stellen nach aktuellem Stand der Forschung das höchste Risiko dar, an einem Mammakarzinom zu erkranken (Varol et al. 2018). Der genauen Erhebung der Familienanamnese kommt hierdurch noch einmal besondere Bedeutung zu.

7.2 Diagnostik

Zur Früherkennung des Mammakarzinoms werden in Deutschland die jährliche Tastuntersuchung der Brust ab einem Alter von 30 Jahren und ab einem Alter von 50 Jahren die Mammographie in jedem zweiten Jahr angeboten. Frauen mit positiver Familienanamnese oder einer bereits nachgewiesenen Mutation in den oben genannten Genen, wird zu einer frühen und intensivierten Krebsvorsorge geraten (Wörmann 2017).

Neben der Mammografie stehen weitere apparative Untersuchungen der Brust, wie die Sonografie oder eine Magnetresonanztomographie (MRT) zur Verfügung.

Eine wichtige Entscheidungshilfe über die Erforderlichkeit erweiterter diagnostischer Schritte bietet die Stadieneinteilung der UICC (Union internationale contre le cancer). Ihre Stadieneinteilung orientiert sich dabei im Wesentlichen an der TNM-Klassifikation (Tabelle 1).

Ab einem Erkrankungsstadium nach UICC der Stufe 2 oder höher, wird ein Staging mittels Computertomographie (CT) angeschlossen (Merino Bonilla et al. 2017).

7.3 Pathologie

Etwa 20% der in der Mammographie detektierten Läsionen der Brust sind auf das Duktale Carcinoma in Situ (DCIS) zurückzuführen (Ernster et al. 2002). Das DCIS stellt eine eigenständige Pathologie aus der Proliferation von malignen Epithelzellen dar, welche duktal oder lobulär begrenzt sind. Ein DCIS wächst zunächst nicht invasiv in das umliegende Stroma aus (Bijker et al. 2013). Unbehandelt können 39% der DCIS innerhalb von 30 Jahren in einen invasiven Tumor übergehen (Sanders 2005). Aufgrund erweiterter therapeutischer Ansätze liegt die Brustkrebs-spezifische Mortalitätsrate hierzu bei 3,3% (Narod et al. 2015).

Zur Einteilung des Mammakarzinoms werden mehrere Parameter herangezogen. Zunächst besteht die allgemeine Stadieneinteilung mittels *Tumor-Node-Metastasis*-Klassifikation, kurz TNM, nach der Größe des Tumors, der Anzahl befallener Lymphknoten und bestehender Fernmetastasen. Zur Übersicht dient Tabelle 1 (Sawaki et al. 2019). Die TNM-Kriterien werden in der UICC-Klassifikation zusammengefasst, nach der sich auch die Therapieempfehlungen richten (Cserni et al. 2018).

Tabelle 1: Einteilung eines Mammakarzinoms nach der TNM-Klassifikation.

TNM-Klassifikation	Tumorausbreitung
Tis	Carcinoma in Situ
T1	Tumorgröße ≤ 2 cm
T2	Tumorgröße zwischen 2 cm und 5 cm
T3	Tumorgröße > 5 cm
T4	Tumor, der die Brustwand oder die Haut infiltriert, unabhängig seiner Größe
N1	Nachweis von Tumorzellen in den beweglichen Lymphknoten der Axilla, Level I-II
N2	Nachweis von Tumorzellen in den fixierten axillärer Lymphknoten des Levels I–II oder klinisch diagnostizierter isolierter Befall ipsilateraler Lymphknoten der Arteria mammaria interna
N3	Nachweis von Tumorzellen in den supra- oder infraklavikulärer Lymphknoten (Level III), bei gleichzeitigem Befall axillärer und Mammaria-interna-Lymphknoten

M	M0: Keine Fernmetastasen M1: Fernmetastasen
---	--

Die aktuellen Leitlinien empfehlen die Graduierung des Mammakarzinoms nach dem modifizierten System nach Elston und Ellis (AWMF, 2020). Das Grading teilt den Tumor über die erreichte Punktzahl in den Dignitätskriterien nach G1 (gering proliferierend) bis G3 (hoch proliferierend) ein. Die Dignitätskriterien setzen sich aus den histologischen Befunden für Kernpolymorphien, tubuläre Strukturen und Anzahl der Mitosen zusammen (Stein 2007).

In der Primärdiagnostik des Mammakarzinoms wird zudem regelhaft der Hormonrezeptorstatus des Tumors bestimmt. Untersucht wird das Gewebe auf das Vorhandensein der Rezeptoren für Progesteron (PR), Östrogen (ER) und den Human-Epidermal-Growth-Factor-Receptor 2 (HER2). Der Hormonrezeptorstatus des Mammakarzinoms hat sowohl eine entscheidende Bedeutung für die Möglichkeiten einer (neo-)adjuvanten Therapie, sowie auch für die Prognose der Patientin. Es werden im Wesentlichen vier Gruppen des Rezeptorstatus unterschieden: ER+/PR+/HER2–, ER+/PR+/HER2+, ER–/PR–/HER2+ und ER–/PR–/HER2– (Chia et al. 2015). Etwa 15-20% der primären Mammakarzinome weisen eine Überexpression von HER2 auf, wobei dieser Rezeptorstatus vor allem mit einer schnellen und aggressiven Tumorprogredienz sowie einem verringerten Überleben in Verbindung gebracht wird, zumindest vor Einsatz HER2-gerichteter Therapien (Muntasell et al. 2017).

Der Rezeptor HER2 gehört zu einer Familie von insgesamt vier homologen, transmembranösen Rezeptoren, die in Abhängigkeit einer Tyrosinkinase in die physiologische Entwicklung und das Wachstum der Brust einbezogen sind. Dabei formen die HER2-Rezeptoren Hetero- oder Homodimere, welche durch Liganden-Bindung stabilisiert und aktiviert werden. Hervorzuheben ist die Beobachtung besonders affiner Liganden-Bindung und Signaltransduktion in jenen Hetero- bzw. Homodimeren, in denen HER2 nachgewiesen werden kann (Cooke et al. 2001). Weder in der Homo- noch in der Heterodimeren Form besitzt HER2 einen direkten Liganden, die Heteromerisation des Rezeptors ist ein wichtiger Mechanismus in der Aktivierung aller Rezeptoren seiner Familie (Wang 2017). Zur Bestimmung des HER2-Rezeptorstatus eines Tumors wird zunächst eine immunhistochemische Färbung (IHC) eines bestimmten Gewebeschnitts des Tumors angefertigt. Sollten die Ergebnisse aus diesem Verfahren nicht eindeutig sein, wird die Nachschaltung eines Tests mittels In-Situ-Hybridisierung (ISH) empfohlen. Dabei kann dieses Verfahren mittels Fluoreszenz (FISH), Chromogen (CISH) oder Silber verstärkt (SISH) erfolgen (Bruder et al. 2019). Die

nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die Empfehlungen der American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists zur Einordnung der Ergebnisse einer Testung auf HER2 (Nitta et al. 2016).

Tabelle 2: Empfehlungen der ASCO zur Einstufung HER2 getesteter Karzinome.

HER2-Rezeptorstatus	Empfehlungen 2013
HER2 positiv	IHC 3+ >10% der invasiven Tumorzellen zeigen uniform intensive Membranfärbung oder eine mittlere Anzahl von $\geq 6,0$ HER2 Kopien pro Zelle in ISH in der einfachen Probe
HER2 zweifelhaft	IHC 2+ > 10% der invasiven Tumorzellen zeigen eine inkomplette oder schwache Membranfärbung oder < 10% der invasiven Tumorzellen zeigen eine intensive Membranfärbung Einfache Probe ISH ergibt eine mittlere Anzahl an HER2-Kopien zwischen $\geq 4,0$ und $< 6,0$ pro Zelle
HER2 negativ	IHC 1+ > 10% der invasiven Tumorzellen zeigen eine schwache inkomplette Membranfärbung IHC 0 Keinerlei Färbung oder < 10% der invasiven Tumorzellen mit einer schwachen inkompletten Membranfärbung Mittlere Anzahl an HER2-Kopien $< 4,0$ pro Zelle in ISH

7.4 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms hängt im Wesentlichen von der Biologie und Ausbreitung des Tumors ab. Neben der (primär) chirurgischen Entfernung, stehen in Abhängigkeit vom Rezeptorstatus und Graduierung des Karzinoms verschiedene (neo-)adjuvante Chemo- bzw.

endokrine und weitere zielgerichtete Therapien zur Verfügung. Darüber hinaus bestehen therapeutische Optionen im Rahmen einer Strahlentherapie (Harbeck et al. 2017).

Da der Rahmen dieser Einleitung dem großen Spektrum der Mammakarzinomtherapie nicht sinnvoll gerecht werden kann, liegt der Fokus im Folgenden auf den, für den Kontext dieser Arbeit relevanten, modernen und zielgerichteten anti-HER2-Therapiekonzepten. Für den HER2-positiven Tumor besitzt derzeit die Kombination aus der systemischen Gabe des humanisierten, monoklonalen Antikörper Trastuzumab, gegebenenfalls ergänzt durch den ebenfalls gegen HER2 gerichteten Antikörper Pertuzumab und einer Chemotherapie die beste Evidenz (Shien et al. 2020). Abbildung 1 gibt einen Überblick über die spezifisch gegen HER2 gerichteten Therapien.

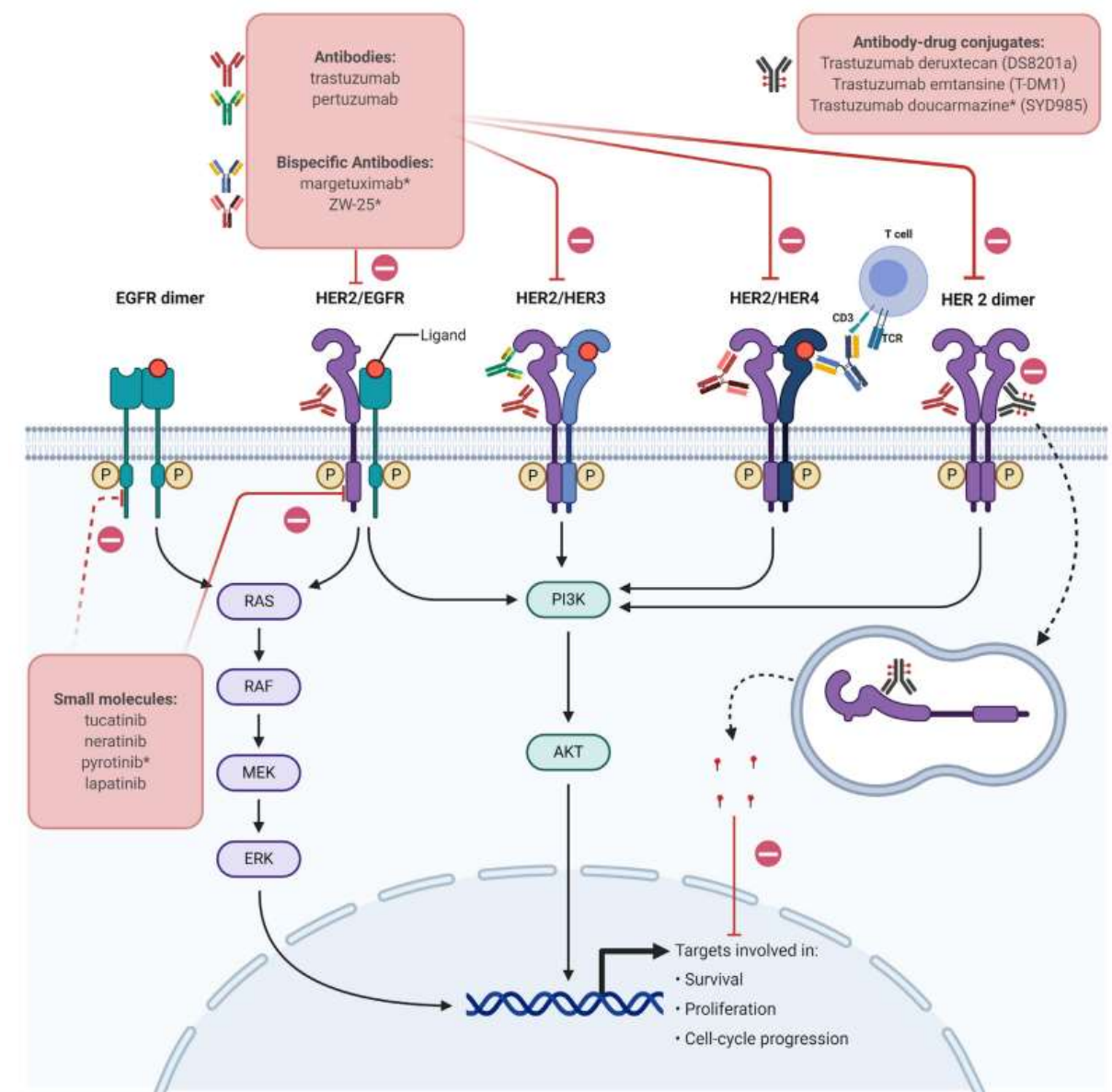


Abbildung 1: Bereits etablierte bzw. sich in der klinischen Erprobung befindliche, gegen HER2 bzw. den HER2-Signalweg gerichtete Therapien (Bredin et al. 2020).

Eine der Grundlagen spezifisch gegen HER2 gerichteter Therapien bilden die monoklonalen Antikörper Trastuzumab sowie Pertuzumab. Der im Kontext dieser Arbeit relevante, rekombinant humanisierte IgG1-Antikörper Trastuzumab blockiert die Wirkung des HER2-Rezeptors durch Bindung an seine extrazelluläre Domäne (Valabrega et al. 2007). Auf der Abbildung zu sehen sind neben diesen, bereits seit langem klinisch etablierten, Wirkstoffen auch die neueren Therapieansätze in Form der Antibody-Drug-Conjugates (ADC) (Ferraro et al. 2021). Diese Klasse der Therapeutika vereint einen Antigen-spezifischen Antikörper mit zytotoxischer Nutzlast. Mit Ado-Trastuzumab Emtansine (T-DM1) kam 2013 ein erstes ADC auf den Markt, 2020 folgte Trastuzumab Deruxtecan (T-DXd). Durch Bindung einer zytotoxischen Komponente, als Nutzlast bezeichnet, an einen humanisierten Maus-Antikörper, hauptsächlich IgG, ermöglichen die ADC eine selektive Krebszellzytotoxizität, nach Bindung an ihr auf diesen exprimierten Zielantigen (Li et al. 2021). Die Freisetzung der zytotoxischen Nutzlast durch Proteasen geschieht dabei nach Endozytose des ADC.

7.5 Bedeutung immunologischer Prozesse für die Tumorentwicklung

Die Bedeutung des menschlichen Immunsystems für die Entwicklung einer Tumorerkrankung ist bereits seit vielen Jahrzehnten Gegenstand intensiver Forschung.

Die Entstehung von Krebs ist charakterisiert durch die Akkumulation variabler genetischer Änderungen und dem Verlust physiologischer zellulärer Regulationsmechanismen (Tian et al. 2011). Voraussetzung für die Fähigkeit des körpereigenen Immunsystems, die Krebszellen dennoch zu erkennen und abzutöten, ist die Infiltration des Tumors mit Immunzellen. Ein solcher Tumor wird in der englischsprachigen Literatur auch als *hot tumor* bezeichnet, während Tumore, in denen eine Infiltration durch Immunzellen fehlt, *cold tumor* genannt werden (Zhang et al. 2022). Im Mikromilieu eines Tumors finden sich dabei sowohl Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), als auch Zellen der adaptiven Immunabwehr, wie T- und B-Zellen (Hinshaw et al. 2019). Relevant für den Schwerpunkt dieser Arbeit ist die Kenntnis der Gruppe der Tumor-infiltrierenden Lymphozyten (TILs), zu welchen neben den NK-Zellen die B- und T-Lymphozyten gehören (Dieci et al. 2018). Um „ihre“ Zielzelle spezifisch auffinden und töten zu können, sind Lymphozyten auf dendritische Zellen angewiesen. Sie präsentieren den Lymphozyten spezifische Antigene der abzutötenden Zellpopulation und sind dadurch für eine gerichtete Immunantwort unerlässlich (Bonilla et al. 2010).

Eine ausreichende Infiltration des Tumors mit Immunzellen ist die Grundvoraussetzung für das Funktionieren von Immuntherapien (Bonaventura et al. 2019). Abbildung 2 gibt einen Überblick über die nach aktuellem Stand der Forschung wichtigsten TILs und ihren hauptsächlichsten Einfluss auf das Tumorwachstum.

TILs werden in bis zu 75% der frühen HER2-positiven Mammakarzinomen nachgewiesen (Dieci et al. 2018). Verschiedene Studien konnten bislang einen positiven Zusammenhang zwischen der Dichte der TILs im Gewebe des Tumors und dessen Ansprechen auf eine neoadjuvante Chemotherapie, in anderen Subtypen des Mammakarzinoms sogar auf eine adjuvante Chemotherapie, demonstrieren (Dieci et al. 2018). Auch ergibt sich eine Bedeutung der TILs auf den Endpunkt der Überlebenswahrscheinlichkeit (Savas et al. 2016). Die Bestimmung der TIL-Dichte in der zu untersuchenden Gewebeprobe erfolgt standardmäßig mittels einer Hämatoxilin-Eosin-Färbung des in Formalin fixierten Präparates (Byrne et al. 2020). Unter denen der Tumorsuppression zugeordneten TILs finden sich auch die NK-Zellen. NK-Zellen sind zytotoxische Mitglieder der Zellfamilie der Lymphozyten und als solche bedeutend für die körpereigene Abwehr von Viren und transformierten Zellen. Sie agieren im körpereigenen Immunsystem im Rahmen der so genannten antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC). Dieser Mechanismus ermöglicht es den Zellen, ohne vorherige Sensibilisierung auf pathologische Strukturen, sondern bereits über den Erstkontakt mit auf deren Membran gebundenen Antikörpern den Zelltod zu induzieren (Mandó et al. 2021). Ihre Relevanz in der frühen Tumorentwicklung wird durch Studien unterstützt, die bei Patienten mit einer verminderten NK-Zell-Aktivität ein gesteigertes Risiko für eine Tumorentstehung feststellen konnten (Muntasell et al. 2017). NK-Zellen machen bis zu 5% der in Brustkrebsgeweben befindlichen TILs aus (Savas et al. 2016). Im HER2-positiven Mammakarzinom unterstützt der Antikörper Trastuzumab die NK-Zellen beim Auffinden der malignen Zellen. Der Wirkstoff bindet an den HER2-Rezeptor der Tumorzellen und ermöglicht so deren Erkennung durch die NK-Zellen (Goutsouliak et al. 2020). Folglich konnte in HER2-positiven Mammakarzinomen gezeigt werden, dass eine hohe Zahl tumorinfiltrierender Lymphozyten mit einem besseren Ansprechen auf eine adjuvante Trastuzumab-Therapie einhergeht (Heppner et al. 2016). Zusätzlich finden sich Hinweise, dass die Gesamtzahl an TILs, insbesondere auch NK-Zellen, im Gewebe des Tumors nach einer Therapie mit Trastuzumab-Docetaxel zunimmt (Muntasell et al. 2017). In einer weiteren Studie wurde zudem ein vermindertes Therapieansprechen auf Trastuzumab bei Patienten mit verringerter NK-Zell-Funktion gezeigt. Hierfür wurden die Aktivitäten der NK-Zellen sowie der Antikörper abhängigen zellulären Zytotoxizität gemessen und die klinische Antwort mittels radiologischer

[illegible]

Für die Steuerung immunologischer Prozesse jedweder Art sind Zytokine im menschlichen Organismus essentiell (Shen et al. 2018). Durch ihre, in Abbildung 3 gezeigte, Induktion des in dieser Arbeit zentralen Chemokins CX3CL1, werden im Folgenden aus der Vielzahl an Zytokinen die beiden Zytokine Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) vorgestellt (Korbecki et al. 2020; Matsumiya et al. 2010; Sukkar et al. 2004). TNF- α ist als erstes Zytokin der durch Makrophagen ausgelösten Signalkaskade an nahezu allen Entzündungsreaktionen im Körper beteiligt und aktiviert unter anderem eine Vielzahl verschiedener Immunzellen, darunter NK-Zellen (Chen et al. 2013). Des Weiteren zählt auch IFN- γ zu den stark proinflammatorisch wirkenden Zytokinen. Es ist der einzige Vertreter der Typ-II-Interferone und wirkt als Zytokin der spezifischen Immunabwehr in gleichem Maße immunaktivierend wie -modulierend (Castro et al. 2018).

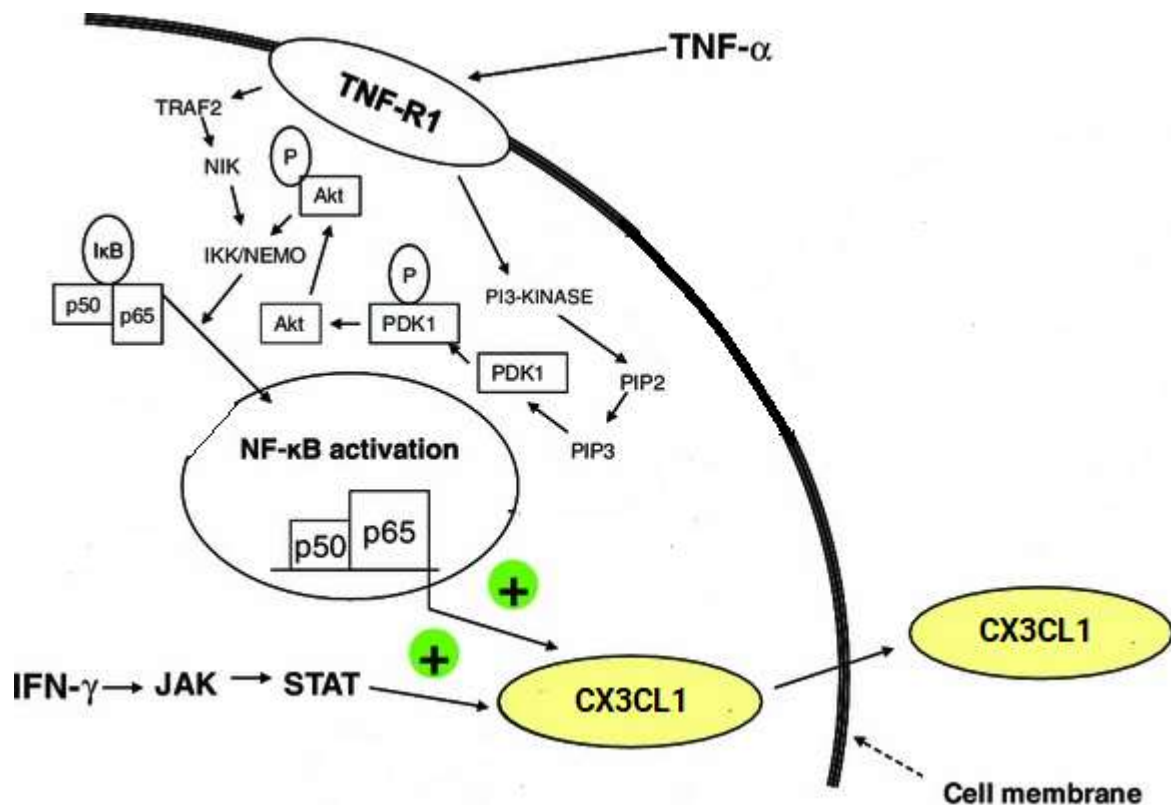


Abbildung 3: Signalwege von TNF- α und IFN- γ , die zu einer Induktion des Chemokins CX3CL1 führen. Modifiziert nach Wojdasiewicz et al. 2014.

7.6 Chemokine in der Tumorimmunologie

Unter Chemokinen bzw. chemotaktischen Zytokinen werden sezernierte Proteine verstanden, die wesentlich für die gerichtete Migration von Immunzellen und die Entwicklung von lymphozytärem Gewebe verantwortlich sind (Nagarsheth et al. 2017). Chemotaktische Zytokine bilden eine Familie von etwa 50 Mitgliedern, die ihre Funktionen in der Aktivierung und Stimulierung immunogener Prozesse mit Hilfe G-Protein gekoppelter Rezeptoren wahrnehmen (Nagarsheth et al. 2017). Derzeit konnten 19 verschiedene Chemokin-Rezeptoren identifiziert werden. Die Gegenüberstellung der Zahl an bislang identifizierten Rezeptoren zur Anzahl an Chemokinen zeigt, dass die Rezeptoren üblicherweise in der Lage sind, unterschiedliche Chemokine zu binden. Darüber hinaus sind auch Chemokine in der Lage, an mehr als einen Rezeptor zu binden (Legler et al. 2016). Bedeutend für die Proteinstruktur der Chemokine sind vier Cysteine, welche zwei charakteristische Disulfidbrücken bilden. Die systematische Nomenklatur der Chemokin-Unterfamilien basiert dabei auf dem Zwischenraum der ersten beiden Cysteine im Protein (Nagarsheth et al. 2017). Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die CX3C-Familie, deren einziger Vertreter CX3CL1 ist.

Chemokine werden in der Mikroumgebung des Tumors von unterschiedlichen Zellen exprimiert; so zum Beispiel von den Tumorzellen selbst, den Fibroblasten, aber auch von Immunzellen. Dabei beeinflussen sie nicht nur die Immunantwort in der Umgebung des Primärtumors, sondern interagieren auch im Mikromileu seiner Metastasen (Nagarsheth et al. 2017). CX3CL1, auch Fractalkin genannt, ist das einzige bekannte Chemokin der CX3C-Unterfamilie. Seine Expression konnte bereits in verschiedenen Organen, sowie auch in Tumorzellen nachgewiesen werden. Bei der Vermittlung von Migration und Adhäsion spielt die Interaktion mit dem CX3CL1-Rezeptor CX3CR1 die entscheidende Rolle, der unter anderem auf CD8-positiven T-Zellen, NK-Zellen, dendritischen Zellen und Monozyten exprimiert ist (Park et al. 2012). In der Interaktion mit seinem Rezeptor, vermittelt die membranständige Form von CX3CL1 die Adhäsion von Immunzellen (Conroy et al. 2020). Dabei fördert es vor allem die Bindung inflammatorischer Monozyten (z.B. CD14, CD16-) an endotheliale Zellen (Ostuni et al. 2020). Durch das *Shedding* von der Membranoberfläche kann CX3CL1 in seine gelöste Form übergeführt werden. Hauptsächlich verantwortlich hierfür sind die Metalloproteasen ADAM17 und ADAM10 (Karan et al. 2003; Sun et al. 2017). Als lösliches Protein wird CX3CL1 in seiner chemotaktischen Aufgabe aktiv. Dabei steuert es die Migration wichtiger tumorsuppressiver Immunzellen (Abbildung 4) (Conroy et al. 2020). In Geweben mit erhöhten Konzentrationen von CX3CL1 konnte zudem eine gesteigerte Anzahl TILs festgestellt werden (Park et al. 2012).

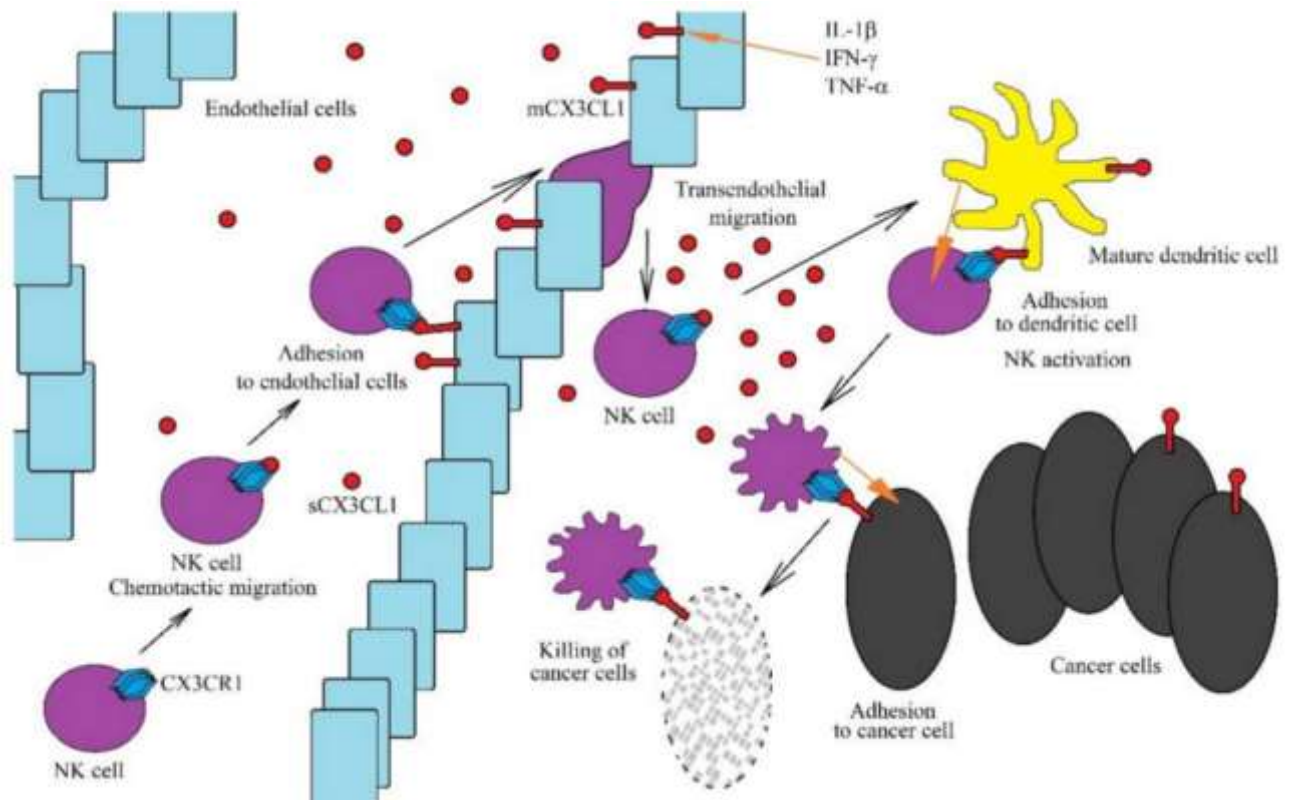


Abbildung 4: Rolle der CX3CL1-CX3CR1-Achse in der anti-Tumor-Funktion von NK-Zellen (Korbecki et al. 2020).

Zum Einfluss von CX3CL1 auf die Entwicklung eines Tumors liegen aktuell widersprüchliche Ergebnisse vor. Einen Anti-Tumoreffekt beschreiben Studien, in denen gezeigt werden konnte, dass Mammakarzinome, die eine hohe Expression von CX3CL1 aufweisen, signifikant kleiner und niedriger im Tumorstatus sind. Zudem war eine hohe CX3CL1-Expression häufiger in Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen zu finden als in Tumoren mit Lymphknotenmetastasen (78.8% vs. 54 57.5%; $p < 0.01$) (Park et al. 2012). Im Gegensatz dazu wurde bei einer anderen Untersuchung des Effekts von CX3CL1 auf die Entwicklung des Mammakarzinoms beschrieben, dass das Chemokin im Zusammenspiel mit Rezeptoren der EGFR-Familie, zu denen unter anderem HER2 zählt, die Tumorentstehung fördert (Tardáguila et al. 2013). In einer weiteren Studie stellte sich heraus, dass CX3CL1 die spinale Metastasierung verschiedener maligner Tumore, darunter Brustkrebs, über den Src/FAK-Signalweg erleichtert, da seine Expression in der Spongiosa die Tumorzellen, die den zugehörigen Rezeptor CX3CR1 tragen, anlockt (Liang et al. 2018). In Abbildung 5 sind weitere diskrepante Ergebnisse aus Untersuchungen zu CX3CL1 in anderen Tumorentitäten aufgeführt.

Die komplexe Funktionalität von CX3CL1 in der Entwicklung von malignem Zellwachstum offenbart ein weites Feld zwischen seinen Funktionen als Regulator von Adhäsion und Migration, aber auch als Moderator im Überleben von pro- wie antitumoralen Zellpopulationen. Nach dem Stand der aktuellen Forschung scheint oftmals die über CX3CR1-vermittelte Signaltransduktion von CX3CL1 einen eher fördernden Einfluss auf die Tumorentwicklung zu haben (Conroy et al. 2020).

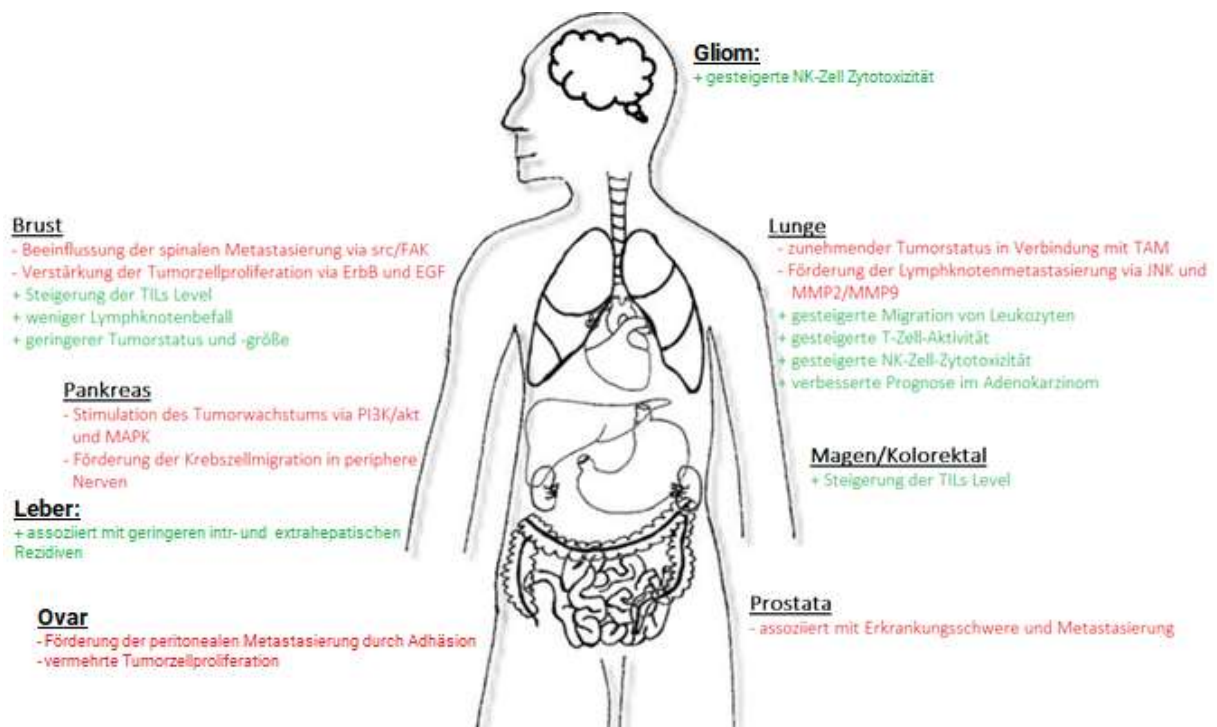


Abbildung 5: Einfluss von CX3CL1 auf die Tumorentwicklung (Conroy and Lysaght 2020; Korbecki et al. 2020). Tumorfördernde Eigenschaften in Rot, tumorsuppressive Eigenschaften in Grün.

8 Zielsetzung und Grundhypothese

Aufgrund seiner dualen Rolle als membranständiges Adhäsionsprotein und lösliches chemotaktisches Zytokin könnte CX3CL1 die ADCC-abhängige Antikörpertherapie verbessern, einerseits durch verbesserte Rekrutierung von NK-Zellen, andererseits durch deren bessere Bindung an die HER2-positive Zielzelle. Als *in vitro*-Modell dienen in dieser Arbeit HER2-positive Mammakarzinomzellen. Ziel war es, die Regulation des Proteins in HER2-positiven Zelllinien erstmals zu untersuchen und methodische Grundlagen für die Überprüfung oben genannter Hypothese *in vitro* zu schaffen.

9 Material

9.1 Zellkultur

Tabelle 3: Verwendete Materialien in der Zellkultur

Produktname	Katalognummer	Firma
Fetal Bovine Serum	S0115	Biochrom
Phosphate Buffered Saline	10010023	GIBCO
Trypsin	R001100	GIBCO
MDA MB 453	HTB - 131	ATCC
MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X)	11140050	GIBCO
HEPES (1M)	15630106	GIBCO
BT 474	HTB 20	ATCC
Serologische Pipetten		ThermoScientific
Petrischalen (tissue culture)		ThermoScientific
Zellkulturflaschen		ThermoScientific
Reaktionsgefäß		Falcon
NK-Zellen	Leukopherese	Freiwilliger Spender
RPMI1640 Medium	21875-034	GIBCO
Streptomycin	11860038	GIBCO
Sodiumpyruvat	11360070	GIBCO
Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM)	31885-023	GIBCO
EDTA	AM9260G	Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)	11539876	GIBCO
Arginin (0,550 mM)	AF094	Sigma-Aldrich
Asparagin (0272 mM)	CAS70-47-3	Sigma-Aldrich

9.2 ELISA

Tabelle 4: Verwendete Materialien für den ELISA

Produktname	Katalognummer	Firma
Bovine Serum Albumin	A1933-1G	Sigma-Aldrich
TWEEN 20	P1379-25ML	Sigma-Aldrich
DUOSet CX3CL1/CXCL10	DY-472	R & D Systems
Recombinant Human Interferon gamma 100 ng/ul	PHC4031	GIBCO

Recombinant HumanTNF alpha 5ng/ul	PHC3016	GIBCO
GI 254023X (10 mM)	15230297	FisherScientific
TAPI-2 (12 mM)	SML0420-1MG	Sigma-Aldrich
Dimethyl Sulfoxide	D2650	Sigma-Aldrich
KH ₂ PO ₄	NIST200B	Sigma-Aldrich
NA ₂ HPO ₄	NIST SRM 2186II	Sigma-Aldrich
KCL	P9333	Sigma-Aldrich
NACL	S9888	Sigma-Aldrich
Streptavidin-HRP	N100	GIBCO

9.3 Western Blot

Tabelle 5: Verwendete Materialien für den Westernblot

Produktname	Katalognummer	Firma
Tris (1,5 M, pH 8,8)	252859	Sigma-Aldrich
SDS 10%	10552785	Fisher Bioreagents
Acrylamid	A9099	Sigma-Aldrich
Ammoniumpersulfat	A3678	Sigma-Aldrich
TEMED	T7024	Sigma-Aldrich
Glycin	G8898	Sigma-Aldrich
TBS	T5030	Sigma-Aldrich
1% Triton x 100	X100	Sigma-Aldrich
Complete EDTA 25x	04693132001	Roche
Vanadate 1mM	450243	Sigma-Aldrich
Glycerol-Phosphat 1 mM	G6501	Sigma-Aldrich
NaF 50 mM	215309	Sigma-Aldrich
Na-Pyrophosphat 10 mM	S6422	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	70166	Milipore
Thermoscientific pre stained protein ladder	94964	Sigma-Aldrich
Monoclonal Anti GAPDH Antibody	G8795	Sigma-Aldrich
Pierce™ Rapid Gold BCA Protein Assay Kit	A53225	ThermoScientific
ECL Reagent	GERPN2209	ThermoFisher
Nitrocellulose Membran Pierce	77012	ThermoScientific
CX3CL1 Clone	MAB365	R & D System
TBST	91414	Sigma-Aldrich
Elektrophoresepuffer	1610734EDU	BioRad
Ponseau Rot	P7170	Sigma-Aldrich

9.4 EU ASSAY

Tabelle 6: Verwendete Materialien für den EU-Assay

Produktname	Katalognummer	Firma
RPMI 1640 Medium	FG1215	Sigma-Aldrich
Delfiabatda Reagent	C136-100	PerkinElmer
Triton X-100	648464	Milipore
Essigsäure	A6283	Sigma-Aldrich
96-Well-V-Bottom Platte	10688892	Falcon
DELFA Eu-Solution	C135-100	PerkinElmer

9.5 Transfektion

Tabelle 7: Verwendete Materialien für die Transfektion

Produktname	Katalognummer	Firma
Lipofectin	18292011	Thermofisher
Vector DNA	pCMV-6-hCX3CL1	Origene

10 Methoden

10.1 Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Zellkulturflaschen unter Hinzugabe des in Tabelle 8 ersichtlichen Mediums bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Inkubator. Die Subkultivierung wurde unter sterilen Bedingungen in einer Laminar Flow Sterilbank durchgeführt.

Tabelle 8: Verwendete Medien der einzelnen Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Spender	Medium	Zusätze zum Medium
MDA-MB-453	Mammakarzinom	48 Jahre, weiblich	DMEM High Glucose	10% FCS, 0,272 mM L-Asparagin, 0,550 mM Arginin und 10 mM HEPES buffer
BT-474	Mammakarzinom	60 Jahre, weiblich	McCoy	10% FCS, 0,272 mM L-Asparagin, 0,550 mM Arginin und 10 mM HEPES buffer
NaturalKillerZellen	Lymphozyten	Divers	RPMI 1640	10% FCS

10.1.1 Subkultivierungsprotokolle

Die für die Subkultivierung verwendeten Substanzen wurden bei 4 °C gelagert und vor der Benutzung bei Raumtemperatur vorgewärmt.

Die Subkultivierung der Zellen erfolgte bei 70-80% Konfluenz. In einem ersten Schritt wurde das Medium aus der Zellkulturflasche oder der Petri-Schale mit einer Aspirationspipette, welche an eine Vakuumpumpe angeschlossen war, aspiriert. Nach einem Waschschrift mit Phosphate buffered saline (PBS) wurde Trypsin (0,25%) hinzugegeben und die Zellen 7-9 Minuten lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert, bis sie sich von der Oberfläche ablösten. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurde nach dem Inkubieren die vierfache Menge des mit FCS versetztem Zellkulturmedium hinzugegeben. Anschließend wurde diese Lösung in ein Reaktionsgefäß pipettiert und bei 1700 rpm für 3 min. zentrifugiert. Danach wurde der

Überstand abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert, um in ein Zellkulturgefäß transferiert zu werden. Die Subkultivierung erfolgte alle drei Tage in einem Verhältnis von 5:1.

10.1.2 Zellzählung

Das Zählen der Zellen wurde mit einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt. Die Neubauer-Zählkammer ist eine Glasplatte mit einer H-förmigen Vertiefung, welche mit einem Deckglas bedeckt wird. Oberhalb und unterhalb der Vertiefung befindet sich in der Platte jeweils ein Zählraster (Abbildung 6). Durch das Bedecken mit dem Deckglas entsteht zwischen den Zählrastern und dem Deckglas eine Zählkammer mit einer Tiefe von 0,1 mm (Abbildung 7). Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau gemischt und in die Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden in beiden Zählrastern jeweils die Zellen gezählt, welche sich in den vier graufarbenen Quadranten (Kantenlänge=1 mm) in den Ecken befanden.

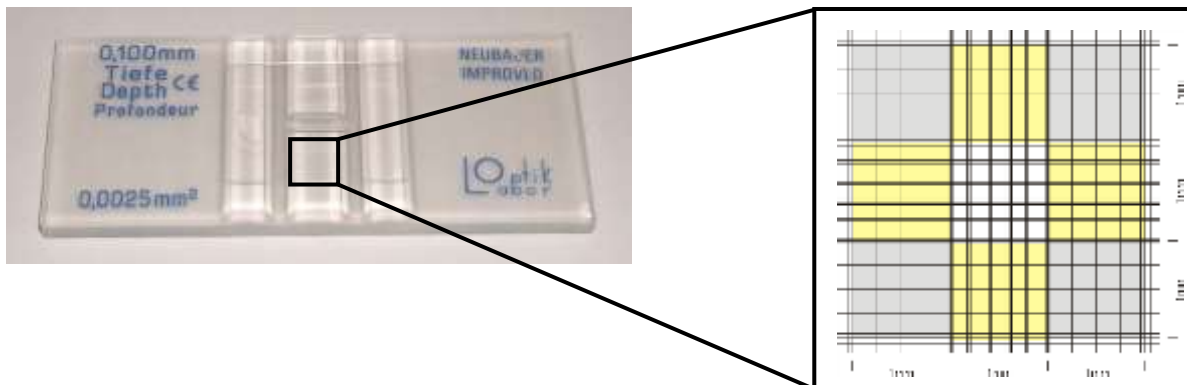


Abbildung 6: Neubauer-Zählkammer. Das Deckglas ist aufgelegt. Schematische Vergrößerung des unteren Zählrasters (rechts). Für die Zellzählung wurden in beiden Zählrastern jeweils die Zellen in den graufarbenen Quadranten gezählt (rechts). Quelle: <https://de.wikipedia.org/wiki/Z%C3%A4hlkammer>



Abbildung 7: Schematische Darstellung einer Neubauer-Zählkammer (Seitansicht). Beide Zählraster haben eine Tiefe von 0,1 mm. Daraus resultiert ein Volumen von 0,9 mm³ je Zählraster. Quelle: http://e-learning.studmed.unibe.ch/hemosurf_demo/Demo_D/Lab/count_manual.htm

Die Zellzahl pro Milliliter wurde mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen in allen Quadranten}}{\text{Anzahl der Quadranten (= 8)}} \times \text{Verdünnungsfaktor (= 2)} \times 10^4$$

10.1.3 Stimulation der Zellen

Um einen möglichen Einfluss verschiedener körpereigener Faktoren auf die Expression des CX3CL1 der Mammakarzinomzellen zu untersuchen, wurden die Zellreihen vor der Durchführung eines ELISA, Westernblot oder EU-Assays stimuliert. Die zur Stimulation verwendeten Substanzen und ihre Verdünnungen sind Tabelle 9 zu entnehmen. Zu Beginn des Stimulationsprotokolls wurden die Zellen nach oben genanntem Subkultivierungsprotokoll aus der Zellkulturflasche gelöst und zu 6×10^5 Zellen pro Well auf einer 6 bis 12 Well Platte ausgesät. Für die darauffolgenden 24 h erhielten die Zellen Hungermedium, bestehend aus DMEM high Glucose mit 1% HEPES, sowie den Aminosäuren L-Arginin und L-Aspartat versetzt. Nach Ablauf der Hungerzeit erhielten die Zellen für einen weiteren Tag Hungermedium, je 440 µl pro Well mit, in 20% mit 0,1% BSA/PBS vermischt. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 60 µl einer Suspension zur Stimulation, aufgeführt in Tabelle 9. Das Gesamtvolumen pro Well betrug 500 µl.

Tabelle 9: Vorverdünnungen der Stimulanzen

Stimulanz	Verdünnung	Medium
IFN- γ 10 ng/ml	1 µl IFN- γ -STOCK (100 ng/ul)	598 µl Hungermedium
TNF- α 10 ng/ml	10 µl TNF- α -STOCK (5 ng/ul)	290 µl Hungermedium
GI 254023X 5 uM (ADAM10-Inhibitor)	4 µl GI-STOCK (10 mM)	476 µl Hungermedium
TAPI-2 50 uM (ADAM17-Inhibitor)	27 µl TAPI-2-STOCK 812 mM)	362 µl Hungermedium
H ₂ O	53 µl H ₂ O	710 µl Hungermedium
DMSO	7 µl DMSO	833 µl Hungermedium
0,1% BSA/PBS	100µl 0,1% BSA/PBS	500 µl Hungermedium

24 Stunden nach Zugabe der Stimulanzen wurden die Überstände der 12-Well Platten in je ein Reaktionsgefäß abpipettiert und zur Detektion des löslichen CX3CL1 mittels ELISA

verwendet. Zur Durchführung eines Westernblot wurden die Zellen 24 h nach Stimulation analog zum Subkultivierungsprotokoll von der 12-Well-Platte abgelöst.

10.1.4 Einfrieren der Zellen

Für das Einfrieren einer Zellkultur wurde diese nach Ablösen aus der Kulturflasche zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Das Einfriermedium setzte sich aus 27 ml FCS und 3 ml DMSO zusammen. Es folgte der Übertrag der Lösung in ein Kryoröhrchen der entsprechenden Beschriftung und die umgehende Bettung in Eis. Bis zur finalen Einlagerung im Stickstofftank wurden die Zellen um 1 °C pro Stunde auf -80 °C heruntergekühlt.

10.1.5 Auftauen der Zellen

Nach Entnahme aus dem Stickstofftank wurde die gefrorene Zelllösung zunächst schrittweise mit RT Vollmedium aufgetaut. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in 8 ml Vollmedium. Das entstehende Zellpellet wurde darauf im Zielmedium resuspendiert und in Kultur gebracht.

10.2 ELISA

Um das von den Mammakarzinomzellen produzierte, lösliche CX3CL1 zu detektieren, wurde das Verfahren des Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der ELISA ausschließlich mit dem DuoSet® ELISA Development System von R&D Systems durchgeführt. Die Arbeitsschritte folgten den Herstellerangaben nach in genannter Literatur beschriebenem Protokoll (Bio-Techne 2022). Das Mischverhältnis des Capture AB in PBS betrug 1:180. Zur Durchführung der Waschschrte wurde eine PBS/0,05% TWEEN-Lösung verwendet. Das Blocken der Wells erfolgte mittels 1% BSA/PBS Suspension zu 250 µl pro Well.

Zur Messung der betreffenden Proben wurden je 100 µl pro Well aus den Überständen der stimulierten Zellen aufgetragen.

Die Verdünnung des im weiteren Prozedere des Assay aufgetragenen Detection-Antibody betrug 1:180 in 1% BSA/PBS.

Nach Durchführung der finalen Assay Arbeitsschritte erfolgte kurz vor der Messung der Proben die Zugabe der Stopplösung, bestehend aus 1M H₂SO₄. Die Zeit nach Zugabe der Lösung bis Messung der Proben betrug maximal 5 Minuten. Gemessen wurde bei 450 nm.

10.2.1 Herstellung des Standards als Messgrundlage des ELISA

Um die Extinktion der verschiedenen Wells der 96-Well-Elisa-Platte in eine Proteinkonzentration umrechnen zu können war die Herstellung eines für den ELISA spezifischen Standards notwendig. Dieser wurde bei der Auswertung des Assays in gleicher Weise wie die Zellproben mitgemessen.

Für den Standard wurde mittels der hCX3CL1-Stocklösung des ELISA-Kit eine 2-fache Verdünnungsreihe in 1% BSA/PBS hergestellt. Die Konzentration reichte von reinem 1% BSA/PBS bis 4 ng/ml.

10.2.2 Herstellung des Waschpuffer für den ELISA

Das Waschen der 96-Well ELISA-Platte erfolgte mit einem speziellen Waschpuffer. Die dafür verwendeten Substanzen sind Tabelle 10 zu entnehmen. Vor der Verwendung wurde der Puffer autoklaviert.

Tabelle 10: Zusammensetzung des ELISA Waschpuffer

Substanz	Menge
KH ₂ PO ₄	2 g
Na ₂ HPO ₄	11,4 g
KCL	2 g
PBS	800 ml
TWEEN	500 µl

10.3 Western Blot

Zur Durchführung des Westernblots ist die vorausgehende Herstellung der unten genannten Gele und Puffer essentiell. Ziel des Westernblots ist es, die in der zu untersuchenden Zellprobe vorhandenen Proteine nach Größe aufzutrennen und mittels spezifischer Antikörperdetektion zu identifizieren.

In Vorbereitung auf den Western Blot ist zunächst die 5-minütige Erwärmung der gewählten Proteinproben in einem Heizblock bei 90 °C erforderlich, um die genannten Proben zu reduzieren und denaturieren, tertiäre wie quartäre Strukturen zu zerstören. Hierzu dient maßgeblich das zuvor hinzugegebene Mecaptoethanol, welches als Reduktionsmittel unter anderem dazu in der Lage ist, Schwefelbrücken zu spalten.

In der folgenden Durchführung einer SDS (Natriumdodecylsulfat) PAGE, werden die verwendeten Proteine durch das anionische Detergens SDS denaturiert. Es gelangen 30 µg Protein in 30 µl Lösung pro Probe in die PAGE.

Zur Funktionsweise des Blots ist zunächst das Angleichen des Startpunktes der verwendeten Proteinproben wichtig. Dies geschieht im Sammelgel. Ohne einen gemeinsamen Start der Moleküle im Blot, wäre eine korrekte Auswertung aufgrund nicht einzelner bzw. klar getrennter Banden, erheblich erschwert. Dazu hängt auch die Validität des mitlaufenden Markers zum Ablesen der Proteingrößen, der Prestained Protein Ladder, von einem korrekten Start in die Trennphase des Blots ab.



Abbildung 8: Wet/Tank Blotting-System
(Quelle: <https://www.bio-rad.com/de-de/category/wet-tank-blotting-systems>)

Das Trenngel erfüllt folglich die Aufgabe der Auftrennung der Proteine in den zu untersuchenden Proben nach Molekülgröße.

Abbildung 8 zeigt das in dieser Arbeit verwendete Wet-Blotting-System. Für die SDS PAGE werden 100 Volt über 60 Minuten verwendet. Der erste Durchgang des Blots wurde bei 88 Volt mit 300 mA durchgeführt. Das Erscheinen der blauen Durchlaufmarkierungslinie am unteren Rand des Trenngels signalisierte das Ende der ersten Runde.

Nach dem die Proben nun nach ihrer Größe aufgetrennt wurden, folgt der Übertrag der im Gel befindlichen Proteine auf die Nitrocellulosemembran.

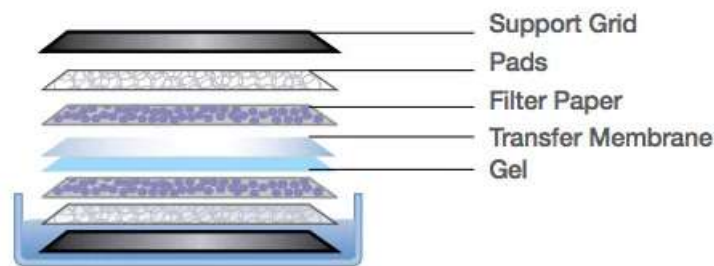


Abbildung 9: Aufbau der Schichtung zum Proteinübertrag auf die Western-Blot-Membran.
Quelle: www.thermofisher.com

Um die Proteine auf die Membran übertragen zu können, musste das Gel aus der vorangegangenen Halterung herausgenommen und nach dem in Abbildung 9 gezeigten Schema in eine neue Halterung übertragen werden. Das Zusammenlegen der Schichten erfolgte unter ständiger Bewässerung der einzelnen Bestandteile mit dem Wet-Blotting Puffer, vergleiche Tabelle 11. Nachdem die umgebaute Kammer wieder in den Blotting-Tank eingefügt wurde, wurde der Tank bis zur Markierung mit Wet-Blotting Puffer gefüllt und in eine Eiswanne gestellt, um ein Überhitzen des Systems während des Übertrags zu vermeiden. Das Blotting-System wurde wiederum an den Strom angeschlossen und bei 350 mA für eine Stunde laufen gelassen.

Nach dem Blotten der Membran erfolgte deren Blockung. Dieser Schritt ist notwendig, um die freien Bindungsstellen der Membran zu besetzen und eine spezifische Antikörpererkennung in den darauffolgenden Schritten zu ermöglichen. Zum Blocken der Membran wurde 5% Magermilchlösung verwendet. Das Magermilchpulver wurde hierfür, wie auch in allen weiteren Anwendungsschritten dieses Blots, in destilliertem Aqua gelöst.

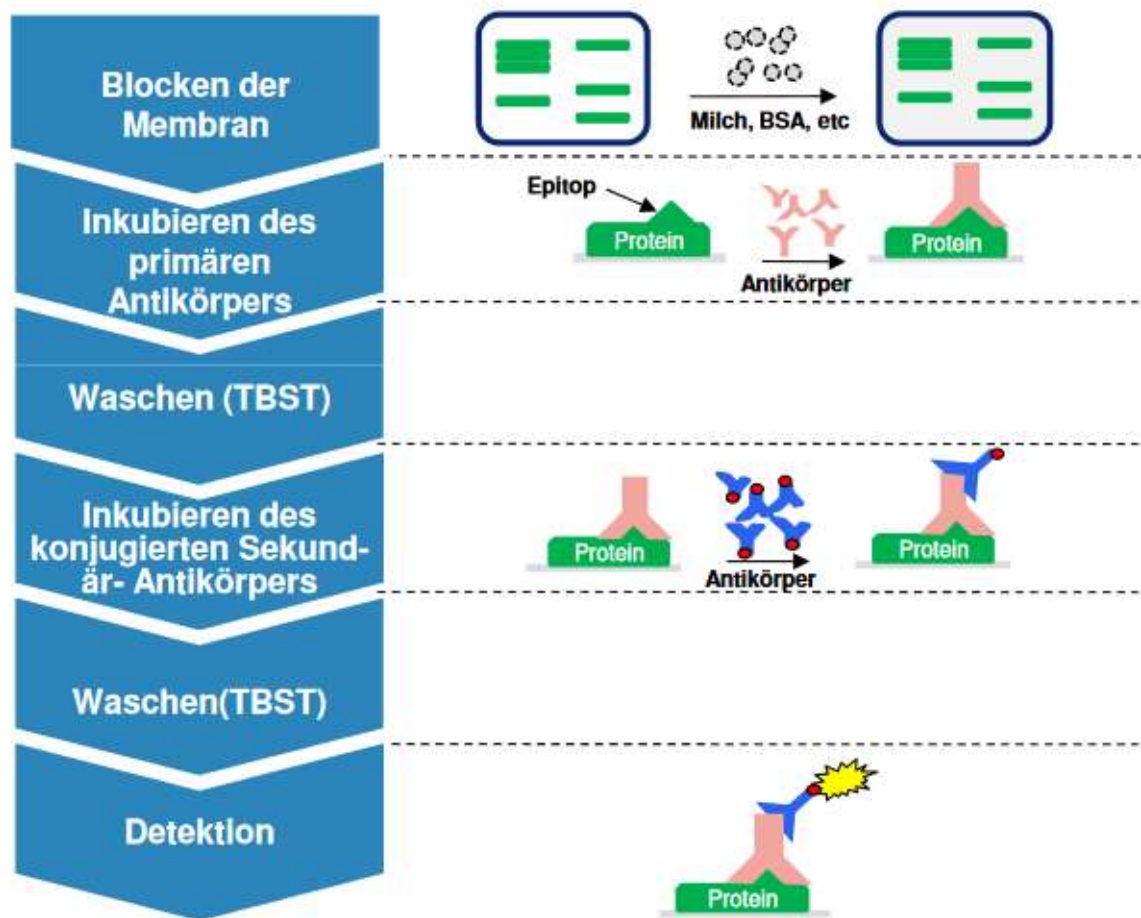


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Ablauf eines Westernblot aus (Cathrin Zeeck 2013)

Der CX3CL1-Mono-Goat Antibody wurde zur Inkubation 1:500 in 2,5% Magermilch. Sobald die Membran eine Stunde mit der 5% Milchlösungen geblockt wurde, wurde die verbliebene Flüssigkeit entfernt und durch 5 ml der Antikörperlösung ersetzt. Es erfolgte wiederum die Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper für eine Stunde auf der Rotationsplatte. Nun wurde die restliche Lösung entfernt und die Membran drei Mal für etwa 5 Minuten mit TBST gewaschen. Während der Wartezeiten im Waschschrift wurde der Sekundärantikörper CX3CL1-Mono-Goat 1:10.000 in 2,5% Magermilch verdünnt. Nach dem Waschen wurde von dieser Lösung 10 ml auf die Membran gegeben und diese noch einmal für eine Stunde auf der Rotationsplatte inkubiert. Im Anschluss an diese letzte Inkubation wurde die Membran, wie oben aufgeführt, drei Mal mit TBST gewaschen. Es folgte die Zugabe von ECL auf die Membran und nach fünf Minuten die Entwicklung des Blots in der Fotokammer.

Um den Proteingehalt der Membran zu verifizieren war und die erhobenen Daten des Westernblots zu normalisieren wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt. Zum einen erfolgte die Darstellung der GAPDH mittels des Primärantikörpers Anti-GAPDH-mouse, sowie

POX-Anti-Mouse nach dem gleichen Schema, wie Eingangs die Detektion der CX3CL1-Antikörper beschrieben wurde. Durch die vorangegangene Bedeckung des Blots mit CX3CL1-Antikörpern war zu Detektion der GAPDH ein Stripping der Membran erforderlich. Beim Stripping handelt es sich um die Entfernung von Primär- und Sekundärantikörpern auf der Westernblot Membran, um diese ohne erneute Versuchsdurchführung zur Färbung anderer Proteine verfügbar zu machen. Das Stripping erfolgte mittels 5% Magermilchlösung. Ein Nachteil der Normalisierung des Westernblots durch Darstellung der GAPDH ist Variation dieses Proteins je nach Zelltyp und Stimulus. Zudem wird das Protein teils so stark exprimiert, dass die detektierten Signale auch außerhalb des linearen dynamischen Bereichs liegen können. Um diesen Effekten entgegenzuwirken bzw. eine weitere Methodik zur Normalisierung des Blots ohne genannte Kritikpunkte hinzuzufügen, wurde die Membran zudem mittels Ponceau-Rot gefärbt.

10.3.1 Herstellung des Wet-Blotting Puffers

Zur Herstellung des Wet-Blotting-Puffers wurden die in Tabelle 11 ersichtlichen Substanzen verwendet. Der pH der Lösung betrug 8,3.

Tabelle 11: Zusammensetzung des Wet-Blotting-Puffers

Substanz	Menge
25 mM Trispulver	3,03 g
192 mM Glycinpulver	14,4 g
Methanol 20%	200 ml
H ₂ O	1 L

10.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellproben für den Westernblot

Die Proteinbestimmung der Proben des Westernblots wurde mit dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific durchgeführt. Hierzu wurde das dem Set beiliegende Protokoll schrittweise exakt befolgt. Die bestimmten Proteinproben wurden nach Durchführung des Kit bis zu Ihrer Anwendung im Westernblot auf Eis gestellt, um einen Proteinabbau zu verhindern. Kurz vor dem Übertrag der Proben in die Proteintaschen des Gels wurde das in den Eppendorfgefäßen befindliche Proteinpellet mit destilliertem Wasser und Transferpufferaufgelöst. Der Tris und Glycin enthaltende Transferpuffer wurde wie auch das ProteinAssay Kit von Thermo Scientific bezogen.

10.3.3 Herstellung des Lysepuffer für die Proteingewinnung

Um die Proteinmengen aus den Zellproben bestimmen zu können, war die Herstellung eines Lysepuffers notwendig. Hierzu wurden die in Tabelle 12 aufgeführten Substanzen vermischt, für 10 min. auf Eis inkubiert und anschließend mit Ultraschall homogenisiert.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Lysepuffer

Substanz	Menge
TBS	3,65 ml
1% Triton	50 µl
Complete EDTA (25-fach)	200 µl
1 mM Vanadate	50 µl
1mM Glycerol-Phosphat	50 µl
50 mM NaF	500 µl
10 mM Na-Pyrophosphat	500 µl
Gesamt	5 ml

10.3.4 Herstellung der Wet-Blotting-Gele

Wie zu Beginn des Abschnitts über diese Methode beschrieben, ist zur Durchführung des Blots die Herstellung von zwei unterschiedlichen Gelen notwendig. Der untere bzw. distale Teil der Form wurde mit dem Trenngel befüllt, der obere bzw. proximale Teil der Form, in dem auch die Taschen zum Auftragen der Proben befindlich sind, wurde mit dem Sammelgel befüllt. Das Trenngel enthielt insgesamt 10% Acryl, während die Konzentration des Acryls im Sammelgel 4% betrug. Die Zusammensetzungen der beiden Gele sind Tabelle 13 und Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 13: Zusammensetzung des Trenngels

Substanz	Menge
H ₂ O	4,8 ml
1,5 M Tris-HCL (pH 8,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
40% Acrylamid/Bis	2,5 ml
10% Ammoniumpersulfat	5 µl
TEMED	5 µl

Tabelle 14: Zusammensetzung des Sammelgels

Substanz	Menge
H ₂ O	6,3 ml
0,5 M Tris-HCL(pH 6,8)	2,5 ml
10% SDS	100 µl
40% Acrylamid	1 ml
10% Ammoniumpersulfat	1 ml
TEMED	10 µl

10.4 EU Assay

Damit die Zellen im Rahmen des EU-Assays ausgemessen werden konnten, mussten sie zunächst gelabelt werden. Dazu wurden sie nach obigem Protokoll kultiviert und stimuliert. Am Tag des Assays wurden Falcons zu je 500.000 Zellen bereitgestellt und die Zellen in 10 ml EU-Medium gewaschen. Das verwendete EU-Medium setzt sich zusammen aus RPMI 1640 ohne Indikator mit 10% hitzeinaktiviertem FCS. Der Überstand der Flacons wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Zell-Pellet in 200 µl EU-Medium mit 10% FCS und 1 µl Delfi Reagent C136-100 resuspendiert. Es folgte die Inkubation der Falcons für 30 min bei 37 °C 5% CO₂. Alle 10 min. wurden die Zellen hierbei in Ihrer Labellösung resuspendiert. Zellen, die im Rahmen des Assays auf Ihre Lyse-Eigenschaften im Zusammenhang mit Trastuzumab oder dem Antikörper gegen CX3CL1 getestet wurden, erhielten die jeweilige Substanzzugabe, 60 µl einer 20 ng/ml Lösung, nach der ersten Inkubationszeit und wurden anschließend noch einmal für 20 min. inkubiert und dabei ebenfalls alle 10 min. resuspendiert.

Während die Karzinomzellen im Inkubator ruhten, wurde mit der Vorbereitung der NK-Zellen begonnen. Insgesamt wurden sechs Falcons mit 1,4 ml EU-Medium befüllt. Die NK-Zellen wurden aus der Zellkulturflasche abgelöst und ausgezählt, sodass $1,4 \times 10^6$ NK-Zellen in 2,8 ml EU-Medium aufgelöst wurden. Von dieser Suspension wurden 1,4 ml in das nächste Flacon pipettiert und von diesem wiederum in das danebenstehende. Dieser Vorgang wurde so oft fortgeführt, bis eine Verdünnungsreihe von 1:10, 1:5, 1:2,5, 1:1,25, 1:0,6 und 1:0,3 entstand. Von jeder Verdünnungsstufe wurden für jede vorbereitete, modulierte Zellreihe drei Wells mit je 100 µl befüllt.

Sobald die NK-Zellen auf der 96 Well V-Bottom-Platte ausgesät wurden, begann das Plating der Zielzellen. Diese wurden hierzu zunächst in 10 ml EU-Medium mit Stabilizer gewaschen. Der Stabilizer setzt sich zusammen aus Sulfinpyrazone, Natriumhydroxid (NaOH) und Wasser. Für 100 Einheiten des Stabilizers werden 0,2 g Sulfinpyrazone (MW 404,4 g/mol) in 500 µl 2 M NaOH zu 4,5 ml Wasser vermischt.

Nach dem Waschen wurden 100 µl Zellen pro Well auf die Platte gegeben. Wichtig zu beachten war es, dass die 96-Well-V-Bottom-Platte in der letzten Reihe ein leeres Well, eines mit der maximal ausgelösten Zelllyse (Zugabe von Triton) und eines mit der spontanen Zelllyse (entsprach Zellmaterial ohne NK-Zell-Zusatz) enthielt. Nach dem Auftragen der Zellen auf die Platte wurde diese bei 300 rpm und 20 °C für 3 Min. zentrifugiert. Es folgte die Inkubation für 4 Stunden.

Nach der Inkubationszeit wurde die Platte ca. 30 Sekunden entweder per Hand, oder mittels Rotationsplatte vermischt. Das Well in dem die maximale Zelllyse ausgelöst wurde, musste zur Lösung gegebenenfalls geclotteter Zellen einige Male auf und ab pipettiert werden. Die Platte wurde nun nochmals bei 300 rpm und 20 °C drei Min. zentrifugiert. Es folgte das Auftragen von 200 µl Europiumlösung pro Well auf eine 96-Well-ELISA-Platte. Von der V-Bottom-Platte wurden aus jedem Well je 25 µl des Überstandes entnommen und in das entsprechende Well auf der 96-Well-ELISA-Platte mit Europiumlösung übertragen. Vor dem Messen wurde die ELISA-Platte für 5-15 Min. auf der Rotationsplatte vermischt.

Die Messung des Europium-Assays erfolgte im Mikrotiterplatten-Lesegerät Victor im Europium-Programm (405 nm, 15 Min.).

10.4.1 Stimulation der Zellen für den EU-Assay

Für den EU-Assay wurden die Zellen auf einer 6-Well-Platte stimuliert. Hierzu wurden 600.000 Zellen pro Well auf der Platte ausgesät und mit dem für die jeweilige Zellreihe üblichen Medium einen Tag inkubiert. Am zweiten Tag erfolgte ein Wechsel des Mediums. Am dritten Tag wurden die Zellen auf ihr jeweiliges Hungermedium umgestellt. Tag vier begann mit der Stimulation der Zellen nach den Stimulanz-Verdünnung aus Tabelle 15. Pro Well wurden 880 µl Hungermedium und 120 µl Stimulanz aufgetragen. Die Messung bzw. Ausführung des Assays erfolgte nach fünf Tagen.

Tabelle 15: Verdünnung der Stimulanzien EU-Assay

Stimulanz	Verdünnung	Medium
TNF- α (10 ng)	14 μ l TNF- α STOCK (5 ng/ μ l)	406 μ l Hungermedium
PBS/BSA	26 μ l 0,1% BSA/PBS	754 μ l Hungermedium
TAPI-2 (50 μ M)	13 μ l TAPI-2 STOCK (12 mM)	174 μ l Hungermedium

10.4.2 Stimulation der NK-Zellen für den EU-ASSAY

Nachdem die NK-Zellen aufgetaut wurden, wurden sie gezählt. Anschließend wurde den Zellen so viel Medium zugesetzt, dass sich die Konzentration der Zellen auf 5.000.000/ml belief. Zur Stimulation der Zellen wurden 10 μ l Interleukin-2 Stocklösung in 240 μ l NK-Zell-Medium gelöst. Das NK-Zell-Medium besteht aus RPMI1640, Streptomycin, FCS und Natriumpyruvat. Pro Milliliter NK-Zellsuspension wurden 5 μ l der Stimulationslösung hinzugegeben. Die gesamte Suspension wurde nun in ein Well einer 6-Well-Platte aufgetragen und bei 37 °C und 5% CO₂ bis zur Ausführung des Assay inkubiert.

10.4.3 Transfektion der Zellen

Die Transfektion der Zellen in Vorbereitung für den EU-Assay begann bei 50-60% Konfluenz der Kultur in der Zellkulturflasche. Zu Beginn der Transfektion wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen.

Es wurden zwei Reihen (Reihe A und Reihe B) Transfektionslösung vorbereitet: Reihe A bestehend aus 100 μ l GAM und 3 μ g DNA, zu einer Gesamtkonzentration von 2 μ g/ μ l der Lösung. Reihe B enthielt 100 μ l GAM mit 6 μ l Lipofektin. Nach der Inkubationszeit von Reihe A wurde Reihe B zu Reihe A gegeben und die Lösung noch einmal für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die hergestellte Transfektionslösung wurde tropfenweise und spiralförmig auf die Zellen in der 6-Well-Platte gegeben. Die Zellen wurden anschließend 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Daraufhin wurde das Medium abgenommen und durch 2 ml Komplett-Medium ersetzt.

11 Ergebnisse

11.1 Detektion des löslichen CX3CL1 mittels ELISA

Um die beiden HER2-positiven Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-453 und BT-474 hinsichtlich ihrer Expression von CX3CL1 zu charakterisieren wurde die lösliche Komponente des Proteins mittels ELISA in den entsprechenden Zellkulturüberständen detektiert. Untersucht wurde die Expression des Proteins, welches von nativen, nicht stimulierten Zellen exprimiert wurde, sowie die Expression des Proteins durch mit $\text{INF-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ stimulierte Zellen. Die Versuche wurden in technischen Triplikaten durchgeführt und Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels *One-Way Anova* ausgewertet.

In den nativen Zellen zeigten die MDA-MB-453 Zellen eine geringe basale CX3CL1-Expression von unter 1 ng/ml unter denen im Methodenteil angegebenen Versuchsbedingungen (vergl. Abbildung 11 A). Die basale Expression der BT-474 Zellen ergab einen Wert von über 1 ng/ml (vergl. Abbildung 12 A).

Um zu überprüfen, ob die Zelllinien MDA-MB-453 und BT-474 grundsätzlich über ein durch $\text{TNF-}\alpha$ bzw. $\text{INF-}\gamma$ stimulierbares Rezeptoren-Spektrum verfügen, wurden die genannten Stimulanzien in nachfolgend beschriebener Konzentration mit den beiden Zytokinen stimuliert und im Zellüberstand sezerniertes CXCL10 gemessen, das bekanntermaßen durch beide Zytokine induziert wird (Tokunaga et al. 2018; Antonelli et al. 2014; Antonelli et al. 2015). Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 B und Abbildung 12 B dargestellt. Diese verifizieren das Ansprechen der verwendeten Zellreihen auf die beiden inflammatorischen Zytokine durch einen signifikanten Anstieg des gemessenen CXCL10.

Die Zugabe von $\text{TNF-}\alpha$ bzw. $\text{INF-}\gamma$ erfolgte jeweils entsprechend einer in der Literatur üblichen Konzentration von 10 ng/ml. Die Messung der Chemokinkonzentration im Zellüberstand erfolgte 24 h nach der jeweiligen Stimulation.

In beiden Zelllinien wurde $\text{TNF-}\alpha$ zunächst als jeweils alleinige Stimulanz verwendet. Wie in Abbildung 11 A sichtbar, zeigte sich hierunter bei der Zelllinie MDA-MB-453 kein Anstieg der im ELISA gemessenen Konzentration des gelösten CX3CL1. Im Assay der BT-474 Zellen konnte hingegen ein signifikanter Anstieg des Proteins im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen gleicher Zelllinie gemessen werden (Abbildung 12 A, $p < 0,05$). Aufgrund des ausbleibenden Effekts einer alleinigen Stimulation der MDA-MB-453 Zellen mit $\text{TNF-}\alpha$,

wurde im Sinne einer Verstärkung der Stimulation IFN- γ hinzugefügt. Auch unter TNF- α +IFN- γ konnte kein Anstieg der im ELISA gemessenen Fraktion freien CX3CL1 gemessen werden (Abbildung 11 A).

Neben Überprüfung der Induktion von CX3CL1 durch etablierte Stimulanzen in den beiden Zelllinien wurde die Reduktion des löslichen CX3CL1 durch Inhibition seines *Sheddings* von der Membranoberfläche getestet. Hierzu wurden die beiden für diesen Prozess in der Literatur als hauptverantwortlichen genannten Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 inhibiert (Bolik et al. 2022; Karan et al. 2003). Dazu fand zum einen der Breitspektrum-Metalloproteaseninhibitor TAPI-2 in einer 5-molaren Zugabe Verwendung. Daneben kam in der initialen Messreihe der MDA-MB-453 Zellen auch der selektivere ADAM10-Proteaseninhibitor GI254023X in der Konzentration 50 μ M zum Einsatz.

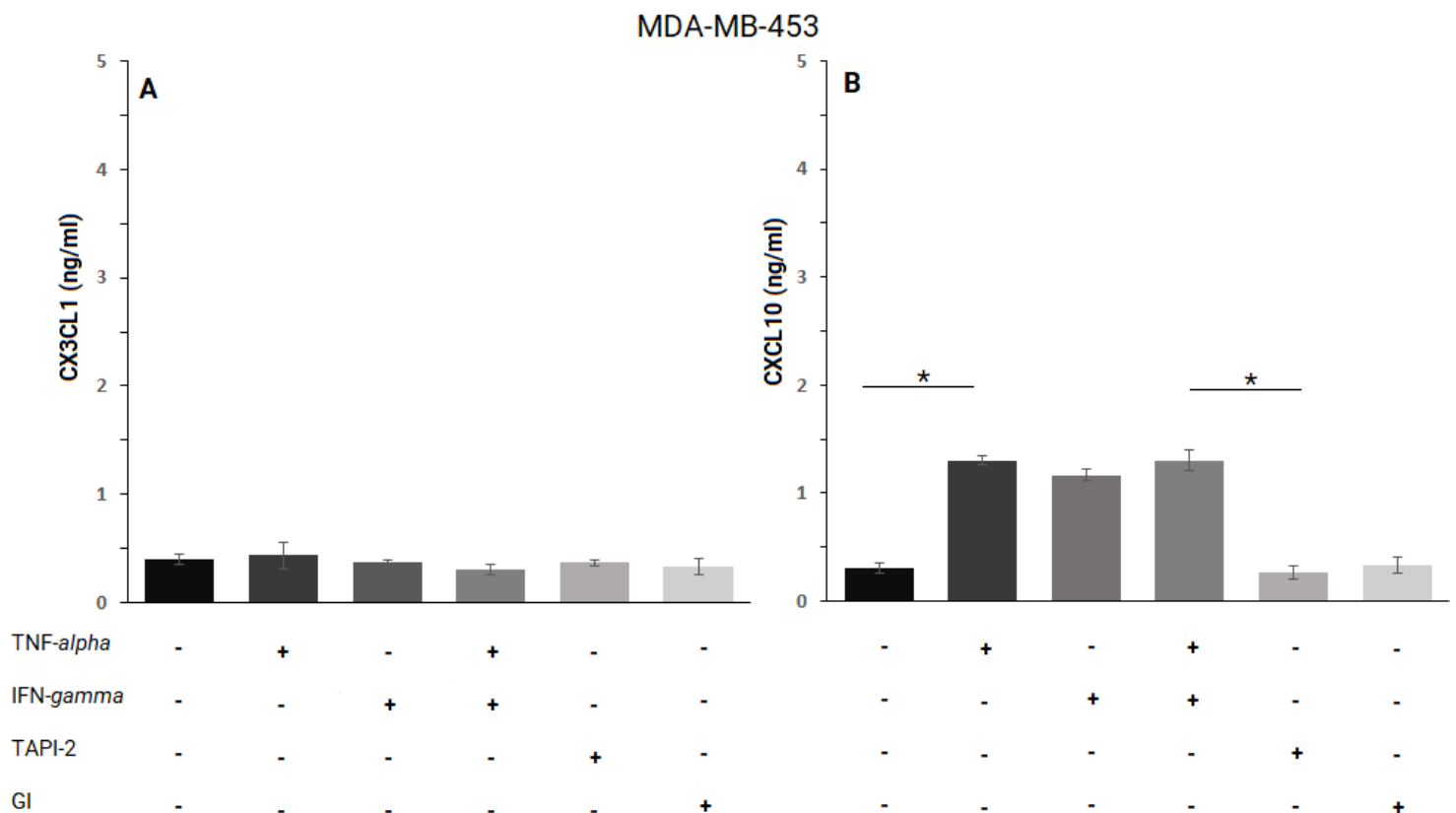


Abbildung 11: Detektion des löslichen CX3CL1 bzw. CXCL10 mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse der HER2-positiven Zelllinie MDA-MB 453. A) zeigt die Sekretion von CX3CL1 in ng/ml nach Stimulation der Zellen mit TNF- α (10 ng/ml) bzw. IFN- γ (10 ng/ml), sowie dem ADAM17-Inhibitor TAPI-2 (5 mM) bzw dem ADAM-10 Inhibitor GI 254023X (50 μ M), den Substanzen in Kombination, sowie den nicht-stimulierten der Zelllinie. B) zeigt die Konzentration von CXCL10 in ng/ml im Zellüberstand als Maß für die Sekretion nach der Stimulation mit unter ‚A‘ genannten Substanzen. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA-Analyse getestet und alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt. *=p<0,05, als Streuungsmaß dient der Standardfehler.

Abbildung 11 A zeigt, dass sich darunter in der gemessenen Konzentration von freiem CX3CL1 in der Zelllinie MDA-MB-453 erwartungsgemäß keine Änderung im Vergleich zu den nativen oder mit proinflammatorischen Zytokinen stimulierten Zellen ergab. Im Gegensatz dazu, konnte in den Zellen der Linie BT-474 eine signifikante Reduktion des Proteins unter der Zugabe von TAPI-2 im Vergleich zu der durch TNF- α stimulierten Probe der gleichen Zellreihe gemessen werden (Vergl. Abbildung 12 A, $p < 0,05$). Aufgrund der sich durch diese Ergebnisse abzeichnenden starken Modulierbarkeit der Konzentration von freiem CX3CL1 durch diese beiden Substanzen wurde auch der Effekt beider Stimulanzien gleichzeitig auf die BT-474 Zelllinie getestet.

Abbildung 12 A zeigt, dass der ausgeprägt stimulierende Effekt von TNF- α auf die Expression von CX3CL1 zwar auch nach der Hemmung des *Sheddings* durch TAPI-2 in den BT-474 Zellen erkennbar bleibt, hervorzuheben ist aber die dennoch signifikant reduzierte CX3CL1-Sekretion nach Einsatz des Protease-Inhibitors ($p < 0,05$).

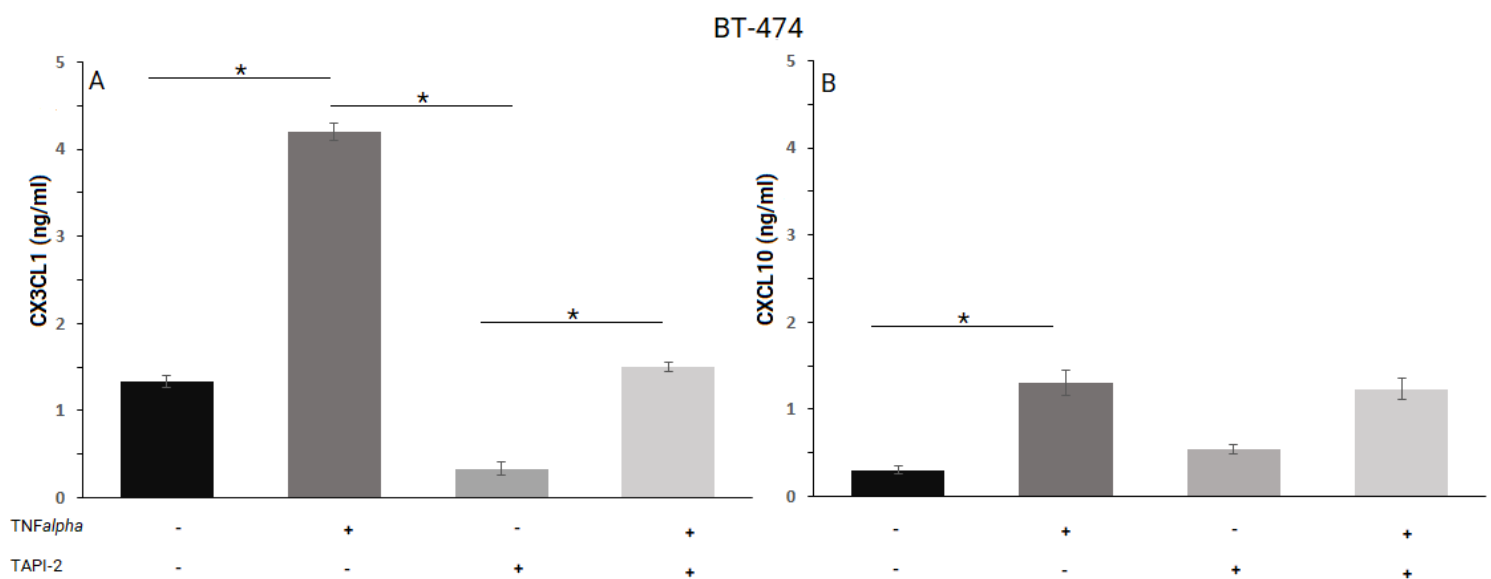


Abbildung 12: Detektion des löslichen CX3CL1 bzw. CXCL10 mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse der HER2 positiven Zelllinie BT-474. A) zeigt die Sekretion von CX3CL1 in ng/ml nach der Stimulation der Zellen mit dem proinflammatorischen Zytokin TNF- α (10 ng/ml) bzw. dem ADAM17-Inhibitor TAPI-2 (5 mM), den beiden Substanzen in Kombination sowie den unbehandelten Zellen. B) zeigt die Sekretion von CXCL10 in ng/ml nach der Stimulation mit oben genannten Substanzen. Die Signifikanz wurde mittels One-Way-ANOVA-Analyse getestet und alle Experimente wurden in Triplikaten durchgeführt *= $p < 0,05$, als Streuungsmaß dient der Standardfehler.

11.2 Detektion des zellulären CX3CL1 mittels Westernblot

Der nächste Schritt zur Charakterisierung der verwendeten HER2-positiven Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-453 und BT-474 hinsichtlich der Fähigkeit zur Synthese von CX3CL1 war die Detektion des zellulären Proteins mittels Westernblot. Analog zu den Ergebnissen aus den Messungen der löslichen CX3CL1-Komponente im ELISA, wurden die Zellen beider Reihen je nativ und nach Stimulation durch TNF- α , IFN- γ und TAPI-2 untersucht. Die Substanzen wurden in gleicher Konzentration nach identischem Stimulationsprotokoll verwendet wie bei den vorangegangenen Experimenten.

CX3CL1 konnte erwartungsgemäß bei 95 kDa detektiert werden. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Beladungskontrolle.

Analog zu den Ergebnissen beim löslichen/sezernierten CX3CL1, zeigte sich in den MDA-MB-453-Zellen auch bei der zellulären Expression von CX3CL1 keine Regulation durch die inflammatorischen Zytokine bzw. durch TAPI-2 (Abbildung 13).

In den BT-474-Zellen konnte dagegen, wie auch im ELISA, eine Regulation von CX3CL1 durch den proinflammatorischen Stimulus mit TNF- α und die ADAM-Inhibition durch TAPI-2 nachgewiesen werden (Abbildung 14). Dieses Ergebnis deckt sich zum einen mit den Erwartungen und Ergebnissen der TNF- α -Stimulation aus dem ELISA, da auch hier eine Zunahme der Expression des Proteins nachgewiesen werden konnte. Zum anderen unterstreicht das Ergebnis die Bedeutung des ADAM(17)-vermittelten *Sheddings* von CX3CL1 durch die Zunahme zellulären CX3CL1 durch TAPI-2.

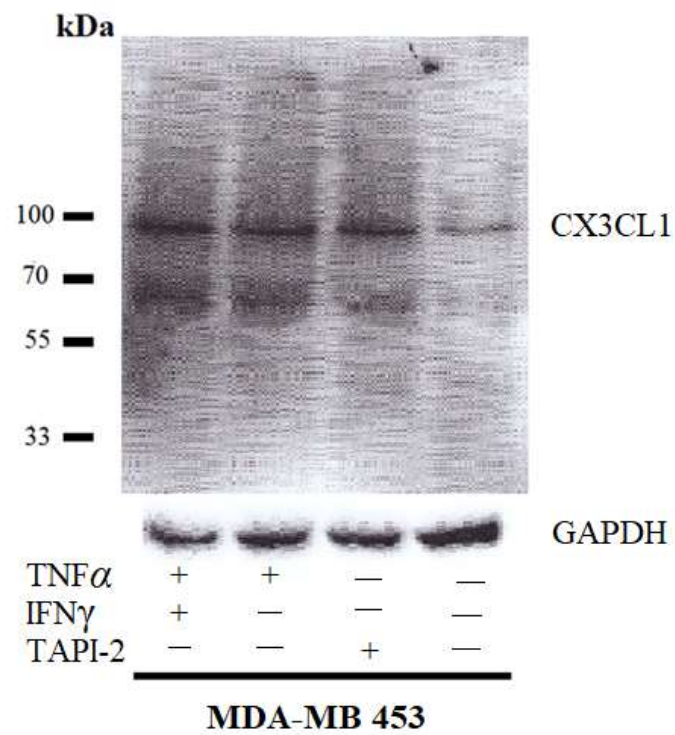


Abbildung 13: Darstellung des zellulären CX3CL1 der Zelllinie MDA-MB-453 in Ruhe und nach Inkubation mit TNF- α und/oder TAPI-2. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Durchführung in Triplikaten.

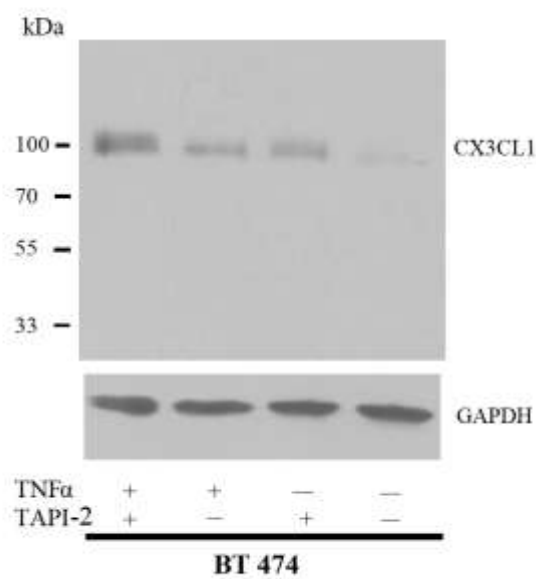


Abbildung 14: Darstellung des zellulären CX3CL1 der Zelllinie BT-474 in Ruhe und nach Inkubation mit TNF- α und/oder TAPI-2. GAPDH diente als Beladungskontrolle. Durchführung in Triplikaten.

11.3 CX3CL1 verstärkt die NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität HER2-positiver Tumorzellen

Nach Abschluss der Charakterisierung der beiden Zelllinien MDA-MB-453 und BT-474 hinsichtlich ihrer Expression und Regulation von CX3CL1 folgte die Durchführung des EU-Assays. Durch diesen Assay sollte *in vitro* nachvollzogen werden, inwiefern eine verstärkte oder schwache Expression des Chemokins die Lyse der Tumorzellen durch NK-Zellen beeinflusst.

Abbildung 15 und Abbildung 16 zeigen die Ergebnisse als Kurvendiagramm. Auf der X-Achse ist das Verhältnis von NK- zu Tumorzellen in den einzelnen Wells aufgetragen. Auf der Y-Achse ist die Zelllyse in Prozent abzulesen. Die Ergebnisse des EU-Assays wurden mittels One-Way-ANOVA-Analyse auf statistische Signifikanz hin untersucht. Die Ergebnisse des Transfektionsassays der MDA-MB-453 Zellen (Abbildung 15 B, b) wurden mittels t-Test für unabhängige Stichproben analysiert, da hier der Vergleich von lediglich zwei Gruppen durchgeführt wurde.

In der CX3CL1-negativen, TNF- α -sensitiven Zelllinie MDA-MB-453 hatte TNF- α keinen positiven Effekt auf die Zelllyse. Nach wiederholter Durchführung des Assays, lag der Mittelwert der maximalen Zelllyse nach Zugabe dieser Stimulanz bei rund 57%, vergleichbar mit den lediglich mit BSA behandelten Zellen nach Zugabe der höchsten Konzentration an NK-Zellen in diesem Bereich. Die Lyse der Zellen wurde jeweils mit und ohne Zugabe eines blockierenden CX3CL1-Antikörper untersucht. Auch hinsichtlich dieser Vergleichsgruppen ließ sich kein Effekt auf die Zelllyse feststellen. Bei beiden Gruppen stellte sich in der Maximalausprägung ein Lysewert um knapp unterhalb von 60% ein. Es ist davon auszugehen, dass der CX3CL1-Gehalt der MDA-MB-453 Zellen bereits so gering ausgeprägt ist, dass eine antikörpervermittelte Blockade auf die im Assay gemessene Lyse keinen detektierbaren Einfluss hat. Zusätzlich wurde die Lyse der Zellen unter Hinzugabe des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab bestimmt, der an die HER2-Rezeptoren bindet. Genutzt wurde dieser Antikörper als Positivkontrolle, um die durch ihn provozierte Zelllyse mit der einer vermehrten CX3CL1-Produktion zu vergleichen. In der MDA-MB-453 Zelllinie erreichte die Zugabe von Trastuzumab allein eine Steigerung der Zelllyse auf knapp unter 90% (vergl. Abbildung 15 A).

Da die MDA-MB-453-Zellen CX3CL1-negativ sind, stellten sie ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Frage dar, ob eine Überexpression von CX3CL1 *per se* ausreichend ist, um die Lyse durch NK-Zellen zu erhöhen. Um eine stabile Überexpression des Proteins zu

erreichen wurden die Zellen mittels CX3CL1-kodierendem Expressionsplasmid transfiziert. Vor Durchführung des Lyseassays erfolgte eine Prüfung des Ergebnisses der Transfektion mittels ELISA, der eine etwa vierfach erhöhte CX3CL1-Sekretion zeigte (Abbildung 15 b). Im Vergleich zu Leervektor-transfizierten Kontrollzellen verbesserte die CX3CL1-Expression die NK-Zell-vermittelte Zellyse um ca. 20% ($p < 0,05$; Abbildung 15 B).

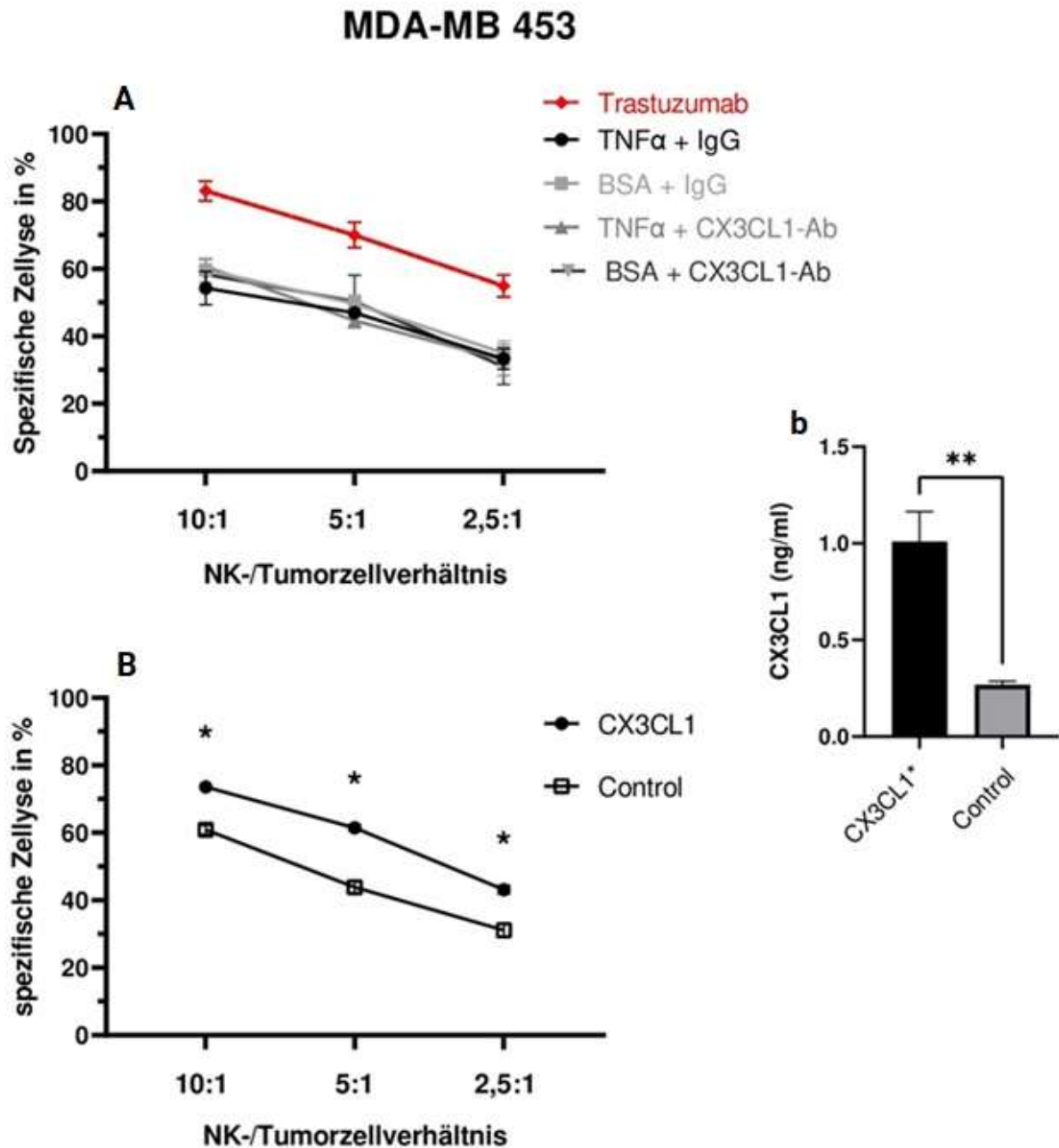


Abbildung 15: Europium-Lyse-Assay der Zelllinie MDA-MB-453. A zeigt die Veränderung bzw. Steigerung der Lyse der Tumorzellen durch die NK-Zellen, nachdem eine der beiden Gruppen erfolgreich mit CX3CL1 transfiziert wurde (CX3CL1), im Vergleich zur leer transfizierten Kontrollgruppe (Control). b) dient als Erfolgskontrolle der Transfektion mittels ELISA (** $p < 0,05$). B) zeigt die Lyseraten unter Verwendung folgender Zusätze und Stimulanzen: Trastuzumab, TNF- α und IgG, BSA und IgG, TNF- α und CX3CL1-Antikörper, BSA und CX3CL1-Antikörper. Durchführung in

Triplikaten. Die Signifikanz wurde durch t-Test ermittelt. $*p < 0.05$, als Streuungsmaß dient der Standardfehler.

In den BT-474-Zellen zeigte sich ein anderes Bild. Die Lyse der Zellen nach Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ konnte gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe um mehr als 20% gesteigert werden (Abbildung 16). Der maximal erreichte Lysewert der lediglich mit BSA kultivierten Zellprobe lag bei 56%, während die nach $\text{TNF-}\alpha$ -Stimulation gemessenen Zellen einen Wert um 78% ergaben ($p < 0,05$). Auch die Hinzugabe von TAPI-2 erhöhte die gemessene Lyse. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erzielten die so behandelten Zellen einen maximalen Wert von gerundeten 63% und damit etwas weniger als 10% mehr als die nativen Zellen. Dieses Ergebnis verfehlte jedoch das statistische Signifikanzniveau. Auch in diesem Versuch stieg die Lyse der Zellen nach Hinzugabe von Trastuzumab nochmals deutlich an. Die hier maximal erreicht Zelllyse lag bei den BT-474-Zellen leicht über 90% und somit höher als die der MDA-MB-453-Zellen. Bei Durchführung des Lyseassays der BT-474-Zelllinie für diese Arbeit lagen methodische Probleme in der suffizienten Kultivierung und Inkubation der Zellen mit CX3CL1-Antikörper vor. Die Relevanz dieses Versuchs bei einer CX3CL1-positiven Zelllinie wird im folgenden Kapitel nochmals diskutiert werden.

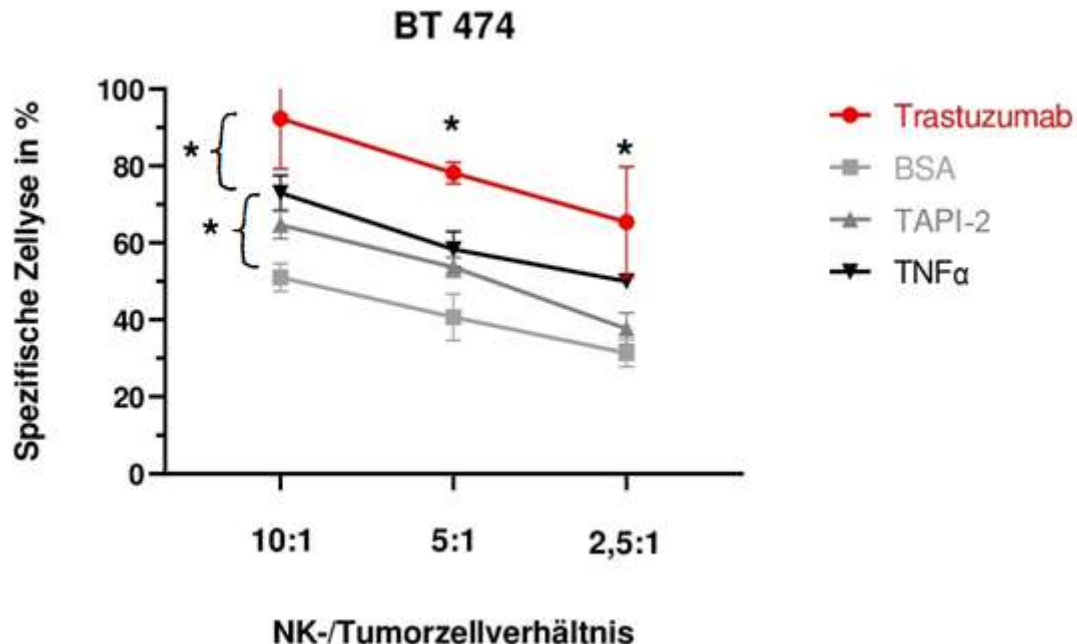


Abbildung 16: Europium-Lyse-Assay der BT 474 Zellen. Anfertigung in Duplikaten.

Die Signifikanztestung erfolgte mittels One-Way-ANOVA-Analyse. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf die mit Klammern gekennzeichneten Werte. $*p < 0,05$

12 Diskussion

Ein zentraler Ansatz der Tumorimmunologie beschäftigt sich mit der Transformation eines „kalten“, den Mechanismen körpereigener Immunabwehr entkommenen Tumors, hin zu einem von Immunzellen infiltrierten, „heißen“ Tumor. Diese Inflammation ist eine elementare Voraussetzung für die erfolgreiche Immuntherapie vieler Krebserkrankungen. So zum Beispiel bei der Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms durch Trastuzumab, ein monoklonaler Antikörper, der sich direkt gegen die entsprechenden Tumorantigene richtet (Baselga 2010). Die Rekrutierung tumor-suppressiver Lymphozyten hängt dabei wesentlich von der Anwesenheit bestimmter Chemokine ab. So wird in der Literatur entitätsübergreifend die Expression der Liganden des Chemokinrezeptors CXCR3 als prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine Immuntherapie beschrieben (Oyanagi et al. 2019; Litchfield et al. 2021). Über das Chemokin CX3CL1 ist dabei bisher lediglich bekannt, dass es neben dem Anlocken tumorsuppressiver Lymphozyten auch deren Bindung an die markierten Tumorzellen durch seine membranständige Form beeinflussen könnte (Bronger et al. 2019). Ergebnisse dieser Arbeit sind dabei in neue Erkenntnisse eingeflossen, welche eine CX3CL1-vermittelte Effektivitätssteigerung von Trastuzumab auch in HER2-niedrig exprimierenden Tumoren zeigen konnten (Dreyer et al. 2021).

12.1 Charakteristika der CX3CL1-Expression

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen konnten zunächst Aussagen über die Regulation der CX3CL1-Expression in zwei unterschiedlichen HER2-positiven Mammakarzinom Zelllinien getroffen werden. So zeigten sich die MDA-MB-453 Zellen gegenüber einer Stimulation mittels inflammatorischer Zytokine nicht sensitiv für eine vermehrte Expression dieses Chemokins. Dagegen ließen sich bei den Zellen der Linie BT-474 durch selbige Stimulation eine relevante CX3CL1-Induktion messen. Die Verwendung der inflammatorischen Zytokine TNF- α und IFN- γ ist dabei repräsentativ für das Mikromilieu von Tumoren *in vivo*, eine Stimulation von malignen Zellen zur CX3CL1-Expression durch diese Substanzen somit plausibel (Mantovani et al. 2008). Die Literatur beschrieb den stimulierenden Effekt des IFN- γ auf transkriptionaler Ebene auf Interferon ansprechende Signalproteine schon früh (Luster et al. 1985). Primäre Quelle des Zytokins bilden im angeborenen Immunsystem die NK-Zellen, in der adaptiven Immunantwort CD4 und CD8-positive TH1-Zellen

(Schoenborn et al. 2007). Analoge Signalwege von IFN- γ finden sich dadurch in seiner Effektivität der Tumorkontrolle, wie auch der Immunabwehr intrazellulärer Pathogene (Schoenborn et al. 2007). Eine synergistische Induktion von CX3CL1 durch die beiden Zytokine IFN- γ und TNF- α , wie sie sich in unserer Arbeit zeigt, konnte unter anderem auch an vaskulären Endothelzellen nachvollzogen werden (Matsumiya et al. 2010). Die Fähigkeit zur Stimulation der Tumorzellen, bestimmte Proteine zu exprimieren, können Zytokine über eine direkte Adhäsion an die Zielzelle mittels ihres Zytokinrezeptors ausüben (Mollica Poeta et al. 2019). Der zweite wichtige Aspekt der Zytokinfunktion *in vivo* ist die Rekrutierung von TILs via Chemotaxis (Savas et al. 2016). Zu denen in das Tumorgewebe migrierenden Lymphozyten gehören auch NK-Zellen. Deren bekannt positiver Effekt auf die Tumorsuppression (Savas et al. 2016) wurde in dieser Arbeit in Zusammenhang mit erhöhten CX3CL1-Spiegeln in Zelllyse-Assays weiter untersucht.

Gezeigt werden konnte, dass eine Überexpression von CX3CL1 mit einer Verbesserung der Tumorzell-Lyse durch NK-Zellen *in vitro* einhergeht. Besonders deutlich gelang dies nach stabiler Transfektion der nativ nur gering CX3CL1-exprimierenden Zelllinie MDA-MB-453. Dieses Ergebnis unterstreichend, wird in der Literatur die vermehrte Migration von Immunzellen, darunter vor allem NK-Zellen, in neoplastische Gewebe mit erhöhter CX3CL1-Expression beschrieben. Erklärt wird dieser Effekt unter anderem mit der gesteigerten Retention von Immunzellen an den umliegenden Gefäßwänden durch Bindung an CX3CL1 (Korbecki et al. 2020). Auch Zeng und Kollegen (Zeng et al. 2007) konnten durch Zell-Migrations-Assays und Immunhistochemie eine vermehrte Migration von Immunzellen in CX3CL1-reichem Neuroblastomgewebe nachweisen. Auf diesen Beschreibungen stützend legen unsere Ergebnisse nahe, dass durch eine erhöhte CX3CL1-Expression der Tumorzellen vermehrt tumorsuppressive NK-Zellen in den direkten Zellkontakt treten und deren Lyse dadurch induzieren. Ähnlich anschaulich konnte dieser tumorsuppressive Effekt unter NK-Zell-Zugabe nach Stimulation der BT-474 Zelllinie mittels TNF- α und daraus resultierender CX3CL1-Überexpression unterstrichen werden. In unserer Arbeit nicht exakt zu trennen ist der Anteil des Effekts der direkten Zytotoxizitätssteigerung von NK-Zellen durch TNF- α ohne einen CX3CL1-Effekt an der gemessenen Gesamtlyse (Wang et al. 2012). Da sich im Zelllyse-Assay der CX3CL1-negativen, TNF- α -positiven Zelllinie MDA-MB-453 keine Verbesserung nach TNF- α -Stimulation, in der CX3CL1-positiven Zelllinie BT-474 eine solche jedoch deutlich zeigte, kann man allerdings einen Anteil von CX3CL1 an den TNF- α -vermittelten Effekten zumindest unterstellen. Von großer Bedeutung zur Differenzierung dieses Effekts ist die Durchführung des Europium-Lyse-Assays nach Inkubation der BT-474-Zellen mit einem

anti-CX3CL1-Antikörper. In dieser Arbeit aufgrund weiter oben bereits angesprochener, methodischer Probleme nicht durchgeführt, ist die Verwendung eines anti-CX3CL1-Antikörpers im Europium-Lyse-Assays der nächste, wesentliche Schritt. Der alleinige Einfluss von TNF- α auf Tumorzellen verschiedener Entitäten ist in der Literatur diskrepant beschrieben. Neben des mindestens mild suppressiven bis statischen Effekts auf die Tumorzellen durch direkte Zytotoxizität über seinen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-1 (TNFR-1) (Idriss et al. 2000), finden sich auch Beispiele für Tumorphilisation, unter anderem durch Induktion des Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ-2 (PAI-2), von welchem angenommen wird, dass er Zellen vor Apoptose schützt (Zidi et al. 2010). Der Mechanismus, über den PAI-2 die Apoptose einer Zelle inhibiert, wird über seine transkriptionelle wie strukturelle Nähe bzw. Ähnlichkeit zum Protoonkogen B-Cell-Lymphoma-2 (BCL-2) als Urokinase unabhängig beschrieben (Medcalf et al. 2005). Die Ergebnisse unserer Arbeit lassen in dieser Diskussion keine abschließende Stellungnahme zu.

Unter Zugabe des ADAM17-Inhibitors TAPI-2 und der damit unter anderem einhergehenden Verminderung des löslichen CX3CL1, stellte sich im EU-Assay mit der bereits basal CX3CL1-exprimierenden Zelllinie BT-474 eine Tumorzelllyse von etwa 65% ein (NK-/Tumorzellverhältnis 1:10, Vergl. Abbildung 16). Diesem Ergebnis folgen mehrere Interpretationsansätze. Davon ausgehend, dass TAPI-2 sich nicht an der Stimulation von Chemokinen, insbesondere nicht von CX3CL1, beteiligt, ist die Grundexpression von CX3CL1 der unbehandelten Zellen und denen nach TAPI-2-Behandlung als unwesentlich voneinander abweichend anzusehen. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass TAPI-2 das Verhältnis von sezerniertem zu zellulärem CX3CL1 (mutmaßlich auch membranständig) hin zu letzterem verschiebt, und dies die für die Verbesserung der NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse die entscheidendere Variante ist. In der wenigen bisher publizierten Literatur zum Unterschied zwischen membrangebundener und löslicher Form von CX3CL1 findet sich allerdings entgegen der beschriebenen Annahme unserer Assays *in vitro* Ergebnisse aus einer Arbeit *in vivo*, die die lösliche Variante des Chemokins als effektiver in der Tumorkontrolle sieht (Rivas-Fuentes et al. 2021). In wie weit diese Beobachtungen jedoch durch die CX3CL1-vermittelte NK-Zell-Tumorzell-Lyse bedingt sind, wird in der genannten Arbeit nicht aufgeklärt. Viel mehr scheinen in jener Arbeit die vielfältigen anti- und protumorigenen Effekte von CX3CL1 eine Rolle spielen. Der Vorteil des in der vorliegenden Arbeit verwendeten *in vitro*-Modells grenzt die Untersuchung zu CX3CL1 auf die direkte Zell-Zell-Interaktion ein. Die beobachteten TAPI-2-Effekte lassen sich jedoch auch CX3CL1-unabhängig erklären. So finden sich in der Literatur viele Belege für eine Korrelation hoher ADAM17-Spiegel im malignen Gewebe mit

Tumorprogression und Aggressivität der Erkrankung (Duffy et al. 2009). Die ADAM-Proteine sind in die Proliferation der malignen Zellen, die Angiogenese des Tumorgewebes und dessen Metastasierung involviert (Lu et al. 2008). Diesen Effekt erzielen die Metalloproteasen durch Rekrutierung und Freisetzung verschiedener Faktoren. Im Mammakarzinom wurde in der bisherigen Literatur vor allem ADAM17 untersucht. Über seine Liganden induziert ADAM17 die Umformung der Faktoren Transforming growth factor- α (TGF- α), Amphiregulin, Heparin-bindendem epidermalen Wachstumsfaktor (HB-EGF), Epiregulin und TNF- α zu aktiven Komponenten (McGowan et al. 2008). Dabei wurde jedem dieser Faktoren bereits fördernde Eigenschaft hinsichtlich Tumorentstehung und Tumorwachstum zugesprochen (Schroeder et al. 1997; LaMarca et al. 2007; Miyamoto et al. 2004). Durch die Inhibition von ADAM17 wurde dagegen eine Reduktion der Tumormetastasierung beschrieben (Bolik et al. 2022). In Zusammenschau dieser Literatur und unseren Ergebnissen kann, neben der Annahme einer erhöhten Potenz des membrangebundenen CX3CL1 auf die Tumorzelllyse, eine selektive ADAM17-Inhibition zur Tumorsuppression als weitere Therapiestrategie mit hohem Potential postuliert werden (Fridman et al. 2007; Lu et al. 2008). Der Schwerpunkt dieser Annahme stützt sich dabei wie beschrieben auf die Literatur, da die dort *in vivo* betrachteten Resultate in dem in dieser Arbeit durchgeführten EU-Assay *in vitro* größtenteils ausgeblendet werden. Ein direkter Einfluss von TAPI-2 auf die Apoptose konnte derzeit, beispielsweise in einer Arbeit an kolorektalen Krebsstammzellen, nicht nachvollzogen werden (Wang et al. 2016). Über die weiteren durch TAPI-2 beeinflussten Proteine, die intrazelluläre Domäne des Notch-Rezeptors (NICD) und der Transkriptionsfaktor Hairy and enhancer of split-1 (HES-1), findet sich in der Literatur keine Untersuchung zu ihrem direkten Einfluss auf die NK-Zellen oder der durch sie vermittelten Tumorzelllyse. Beide Proteine werden durch TAPI-2 reduziert (Wang et al. 2016). Als Teil des Notch-Signalwegs sind sie an der Kontrolle einer Variation an Genen beteiligt, die Einfluss auf die Angiogenese und darüber auf die Tumorprogression nehmen (Kontomanolis et al. 2018). Diese Effekte unterliegen allerdings dem *in vivo* Mechanismus des Immunsystems und sind in den hier durchgeführten *in vitro* Modellen weder nachzuvollziehen noch relevant. Trastuzumab zeigte in unserem Modell erwartungsgemäß eine signifikante Verbesserung der NK-Zell-vermittelten Tumorzelllyse. Dies ist in guter Übereinstimmung mit Arbeiten, die der antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität eine wichtige Rolle bei der Wirkung des Antikörpers bescheinigen (Valabrega et al. 2007). Als HER2-gerichteter Antikörper wird Trastuzumab bereits seit 25 Jahren erfolgreich in der Therapie HER2-überexprimierender Mammakarzinome eingesetzt (Untch et al. 2007). Durch Western-Blots verifizierten wir die HER2-Expression der eingesetzten Mammakarzinomzelllinien, wobei sowohl MDA-MB-453

als auch BT-474 sich als stark HER2-positiv erwiesen (Subik et al. 2010; Holliday et al. 2011). Durch seine Fähigkeit zur Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität ist Trastuzumab als monoklonaler Antikörper in seiner Funktion nicht allein auf die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität angewiesen (Valabrega et al. 2007). In der Weiterentwicklung gerichteter Tumortheraeutika erlangte Trastuzumab in den letzten Jahren Modifikationen im Sinne der Antibody-Drug-Conjugates (ADC). ADCs sind eine neue Substanzklasse, die die Spezifität eines monoklonalen Antikörpers nutzen, um ihre auf Tumorzellen exprimierte Zielantigene zu erreichen und in Folge ihre zytotoxische Nutzlast abzuliefern (Hafeez et al. 2020). Die drei wichtigsten Komponenten der ADC-Therapie bilden die zytotoxische Nutzlast (u.a. Deruxtecan), der monoklonale Antikörper an sich (Trastuzumab), sowie ein Linker, dessen Aufgabe es ist, die zytotoxische Nutzlast erst gezielt an der markierten Tumorzelle freizulassen (Xu et al. 2019). Trotz bedeutenden Therapieerfolgs hat auch die ADC-Therapie mit Resistenzen zu kämpfen. Zwar sind die Mechanismen einer Therapieresistenz noch nicht vollständig geklärt, ein Zusammenhang mit einer insuffizienten Bindung von Trastuzumab an die Tumorzelle ist aber anzunehmen (Derakhshani et al. 2020). Eine verlässliche Stärkung dieser mit der Hilfe von CX3CL1 könnte die weiteren Entwicklung solcher Therapieoptionen stützen. Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass das hier etablierte *in vitro*-Modell zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Chemokinen wie CX3CL1 auf ADCC-abhängige Antikörpertherapien wie Trastuzumab geeignet ist. Im Nachgang zu der hier vorgelegten Arbeit konnte ein signifikanter Effekt von CX3CL1 auf die Trastuzumab-vermittelte ADCC in diesem Modellsystem auch tatsächlich nachgewiesen werden (Dreyer et al. 2021).

12.3 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass CX3CL1 in HER2-positiven Mammakarzinom-Zelllinien exprimiert und regulierbar ist. Weiterhin bieten die durchgeführten Versuche einen Anhalt, dass sich die NK-Zell-vermittelte Tumorzelllyse durch CX3CL1 zu verbessern scheint. Daraus lässt sich der weiterführende Ansatz schließen, dass eine pharmakologische Anreicherung von CX3CL1 in Tumorgewebe eine Antikörper-getriggerte Tumorabwehr möglicherweise verbessert. Daneben stellt auch die Modulation der CX3CL1-Expression, beispielsweise durch ADAM-Inhibitoren, eine potentielle Verbesserung der Immunzell-abhängigen Tumorabwehr in Aussicht. Beide Ansätze vermögen möglicherweise Resistenzen gegenüber monoklonaler Antikörper wie Trastuzumab in der Therapie des HER2-positiven

Mammakarzinoms infolge schwacher Antigenexpression zu überwinden (Muntasell et al. 2017).

Zur Konkretisierung des therapeutischen Nutzens sind ist der Ausbau der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente unter anderem durch die Hinzunahme eines CX3CL1-Antikörpers in der BT-474-Zelllinie, sowie durch die Eingrenzung des Effekts des zellulären CX3CL1 beispielsweise durch die Durchführung einer Membranfraktion, unabdingbar.

13 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Frau Prof. Dr. med. Marion Kiechle, Direktorin der Frauenklinik des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München, bedanken, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter Ihrer Leitung durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. Holger Bronger danke ich für die interessante Promotions-Thematik, seine stete Diskussions- und Hilfsbereitschaft und die kameradschaftliche Atmosphäre in seiner Arbeitsgruppe. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich bedanken.

Ein besonderer Dank gilt meiner Arbeitsgruppe: Daniela Zech, für die Hilfsbereitschaft bei alltäglichen Fragen und allen voran Tobias Dreyer, für die fundierte Einarbeitung, die Durchsicht dieser Arbeit und die vielen fruchtbaren Gespräche und Anregungen.

Prof. Dr. rer. nat. habil. Viktor Magdolen danke ich für die Einladung zur wissenschaftlichen Weiterbildung im Doktorandenseminar und der dadurch gebotenen Plattform zur konstruktiven Diskussion neuer Erkenntnisse.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich ganz besonders herzlich bedanken für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums, ohne die diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Für die finanzielle Unterstützung danken wir der DFG.

14 Literaturverzeichnis

- Antonelli, A., S. M. Ferrari, A. Corrado, A. Di Domenicantonio, and P. Fallahi. 2015. 'Autoimmune thyroid disorders', *Autoimmun Rev*, 14: 174-80.
- Antonelli, A., S. M. Ferrari, D. Giuggioli, E. Ferrannini, C. Ferri, and P. Fallahi. 2014. 'Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases', *Autoimmun Rev*, 13: 272-80.
- Baselga, J. 2010. 'Treatment of HER2-overexpressing breast cancer', *Ann Oncol*, 21 Suppl 7: vii36-40.
- Bijker, N., M. Donker, J. Wesseling, G. J. den Heeten, and E. J. Rutgers. 2013. 'Is DCIS breast cancer, and how do I treat it?', *Curr Treat Options Oncol*, 14: 75-87.
- Bio-Techne, R&D Systems. 2022. 'DuoSet® ELISA Development Systems - ELISA Kits', R&D Systems, Accessed 04-11. <https://www.rndsystems.com/products/duoset-elisa-development-systems>.
- Bolik, J., F. Krause, M. Stevanovic, M. Gandraß, I. Thomsen, S. S. Schacht, E. Rieser, M. Müller, N. Schumacher, J. Fritsch, R. Wichert, E. Galun, J. Bergmann, C. Röder, C. Schafmayer, J. H. Egberts, C. Becker-Pauly, P. Saftig, R. Lucius, W. Schneider-Brachert, R. Barikbin, D. Adam, M. Voss, W. Hitzl, A. Krüger, B. Strilic, I. Sagi, H. Walczak, S. Rose-John, and D. Schmidt-Arras. 2022. 'Inhibition of ADAM17 impairs endothelial cell necroptosis and blocks metastasis', *J Exp Med*, 219.
- Bonaventura, P., T. Shekarian, V. Alcazer, J. Valladeau-Guilemond, S. Valsesia-Wittmann, S. Amigorena, C. Caux, and S. Depil. 2019. 'Cold Tumors: A Therapeutic Challenge for Immunotherapy', *Front Immunol*, 10: 168.
- Bonilla, F. A., and H. C. Oettgen. 2010. 'Adaptive immunity', *J Allergy Clin Immunol*, 125: S33-40.
- Bredin, P., J. M. Walshe, and N. Denduluri. 2020. 'Systemic therapy for metastatic HER2-positive breast cancer', *Semin Oncol*, 47: 259-69.
- Bronger, H., V. Magdolen, P. Goettig, and T. Dreyer. 2019. 'Proteolytic chemokine cleavage as a regulator of lymphocytic infiltration in solid tumors', *Cancer Metastasis Rev*, 38: 417-30.
- Bruder, R., K. Damrau, P. Dippmann, D. Hengelbrock, and D. Lebeau. 2019. 'QS-Verfahren Mammachirurgie Qualitätsaspekte der HER2-Bestimmung im Rahmen der externen Qualitätssicherung.
- Castro, F., A. P. Cardoso, R. M. Gonçalves, K. Serre, and M. J. Oliveira. 2018. 'Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion', *Front Immunol*, 9: 847.
- Chen, D. S., and I. Mellman. 2013. 'Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle', *Immunity*, 39: 1-10.
- Chia, K., M. O'Brien, M. Brown, and E. Lim. 2015. 'Targeting the androgen receptor in breast cancer', *Curr Oncol Rep*, 17: 4.
- Conroy, M. J., and J. Lysaght. 2020. 'CX3CL1 Signaling in the Tumor Microenvironment', *Adv Exp Med Biol*, 1231: 1-12.
- Cooke, T., J. Reeves, A. Lanigan, and P. Stanton. 2001. 'HER2 as a prognostic and predictive marker for breast cancer', *Ann Oncol*, 12 Suppl 1: S23-8.
- Cserni, G., E. Chmielik, B. Cserni, and T. Tot. 2018. 'The new TNM-based staging of breast cancer', *Virchows Arch*, 472: 697-703.
- Derakhshani, A., Z. Rezaei, H. Safarpour, M. Sabri, A. Mir, M. A. Sanati, F. Vahidian, A. Gholamiyan Moghadam, A. Aghadokht, K. Hajiasgharzadeh, and B. Baradaran. 2020. 'Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy', *J Cell Physiol*, 235: 3142-56.
- Dieci, M. V., N. Radosevic-Robin, S. Fineberg, G. van den Eynden, N. Ternes, F. Penault-Llorca, G. Pruneri, T. M. D'Alfonso, S. Demaria, C. Castaneda, J. Sanchez, S. Badve, S. Michiels, V. Bossuyt, F. Rojo, B. Singh, T. Nielsen, G. Viale, S. R. Kim, S. Hewitt, S. Wienert, S. Loibl, D. Rimm, F. Symmans, C. Denkert, S. Adams, S. Loi, and R. Salgado. 2018. 'Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the

- International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer', *Semin Cancer Biol*, 52: 16-25.
- Dreyer, T. F., S. Kuhn, C. Stange, N. Heithorst, D. Schilling, J. Jelsma, W. Sievert, S. Seitz, S. Stangl, A. Hapfelmeier, A. Noske, A. K. Wege, W. Weichert, J. Ruland, M. Schmitt, J. Dorn, M. Kiechle, U. Reuning, V. Magdolen, G. Multhoff, and H. Bronger. 2021. 'The Chemokine CX3CL1 Improves Trastuzumab Efficacy in HER2 Low-Expressing Cancer In Vitro and In Vivo', *Cancer Immunol Res*, 9: 779-89.
- Duffy, M. J., E. McKiernan, N. O'Donovan, and P. M. McGowan. 2009. 'Role of ADAMs in cancer formation and progression', *Clin Cancer Res*, 15: 1140-4.
- Ernster, Virginia L., Rachel Ballard-Barbash, William E. Barlow, Yingye Zheng, Donald L. Weaver, Gary Cutter, Bonnie C. Yankaskas, Robert Rosenberg, Patricia A. Carney, Karla Kerlikowske, Stephen H. Taplin, Nicole Urban, and Berta M. Geller. 2002. 'Detection of Ductal Carcinoma In Situ in Women Undergoing Screening Mammography', *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 94: 1546-54.
- Ferraro, E., J. Z. Drago, and S. Modi. 2021. 'Implementing antibody-drug conjugates (ADCs) in HER2-positive breast cancer: state of the art and future directions', *Breast Cancer Res*, 23: 84.
- Fridman, J. S., E. Caulder, M. Hansbury, X. Liu, G. Yang, Q. Wang, Y. Lo, B. B. Zhou, M. Pan, S. M. Thomas, J. R. Grandis, J. Zhuo, W. Yao, R. C. Newton, S. M. Friedman, P. A. Scherle, and K. Vaddi. 2007. 'Selective inhibition of ADAM metalloproteases as a novel approach for modulating ErbB pathways in cancer', *Clin Cancer Res*, 13: 1892-902.
- Hafeez, U., S. Parakh, H. K. Gan, and A. M. Scott. 2020. 'Antibody-Drug Conjugates for Cancer Therapy', *Molecules*, 25.
- Harbeck, N., and M. Gnant. 2017. 'Breast cancer', *Lancet*, 389: 1134-50.
- Heppner, I. B., M. Untch, C. Denkert, B. M. Pfitzner, B. Lederer, W. Schmitt, H. Eidtmann, P. A. Fasching, H. Tesch, C. Solbach, M. Rezai, D. M. Zahm, F. Holms, M. Glados, P. Krabisch, E. Heck, A. Ober, P. Lorenz, K. Diebold, J. O. Habek, and S. Loibl. 2016. 'Tumor-Infiltrating Lymphocytes: A Predictive and Prognostic Biomarker in Neoadjuvant-Treated HER2-Positive Breast Cancer', *Clin Cancer Res*, 22: 5747-54.
- Hinshaw, D. C., and L. A. Shevde. 2019. 'The Tumor Microenvironment Innately Modulates Cancer Progression', *Cancer Res*, 79: 4557-66.
- Holliday, D. L., and V. Speirs. 2011. 'Choosing the right cell line for breast cancer research', *Breast Cancer Res*, 13: 215.
- Idriss, H. T., and J. H. Naismith. 2000. 'TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)', *Microsc Res Tech*, 50: 184-95.
- Karan, D., F. C. Lin, M. Bryan, J. Ringel, N. Moniaux, M. F. Lin, and S. K. Batra. 2003. 'Expression of ADAMs (a disintegrin and metalloproteases) and TIMP-3 (tissue inhibitor of metalloproteinase-3) in human prostatic adenocarcinomas', *Int J Oncol*, 23: 1365-71.
- Kontomanolis, E. N., S. Kalagasidou, S. Pouliliou, X. Anthoulaki, N. Georgiou, V. Papamanolis, and Z. N. Fasoulakis. 2018. 'The Notch Pathway in Breast Cancer Progression', *ScientificWorldJournal*, 2018: 2415489.
- Korbecki, J., D. Simińska, K. Kojder, S. Grochans, I. Gutowska, D. Chlubek, and I. Baranowska-Bosiacka. 2020. 'Fractalkine/CX3CL1 in Neoplastic Processes', *Int J Mol Sci*, 21.
- LaMarca, H. L., and J. M. Rosen. 2007. 'Estrogen regulation of mammary gland development and breast cancer: amphiregulin takes center stage', *Breast Cancer Res*, 9: 304.
- Legler, D. F., and M. Thelen. 2016. 'Chemokines: Chemistry, Biochemistry and Biological Function', *Chimia (Aarau)*, 70: 856-59.
- Li, L., D. Zhang, B. Liu, D. Lv, J. Zhai, X. Guan, Z. Yi, and F. Ma. 2021. 'Antibody-drug conjugates in HER2-positive breast cancer', *Chin Med J (Engl)*, 135: 261-67.
- Liang, Y., L. Yi, P. Liu, L. Jiang, H. Wang, A. Hu, C. Sun, and J. Dong. 2018. 'CX3CL1 involves in breast cancer metastasizing to the spine via the Src/FAK signaling pathway', *J Cancer*, 9: 3603-12.
- Litchfield, K., J. L. Reading, C. Puttick, K. Thakkar, C. Abbosh, R. Benthall, T. B. K. Watkins, R. Rosenthal, D. Biswas, A. Rowan, E. Lim, M. Al Bakir, V. Turati, J. A. Guerra-Assunção, L. Conde,

- A. J. S. Furness, S. K. Saini, S. R. Hadrup, J. Herrero, S. H. Lee, P. Van Loo, T. Enver, J. Larkin, M. D. Hellmann, S. Turajlic, S. A. Quezada, N. McGranahan, and C. Swanton. 2021. 'Meta-analysis of tumor- and T cell-intrinsic mechanisms of sensitization to checkpoint inhibition', *Cell*, 184: 596-614.e14.
- Lu, X., D. Lu, M. Scully, and V. Kakkar. 2008. 'ADAM proteins - therapeutic potential in cancer', *Curr Cancer Drug Targets*, 8: 720-32.
- Luster, A. D., J. C. Unkeless, and J. V. Ravetch. 1985. 'Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins', *Nature*, 315: 672-6.
- Maes-Carballo, M., I. Muñoz-Núñez, M. Martín-Díaz, L. Mignini, A. Bueno-Cavanillas, and K. S. Khan. 2020. 'Shared decision making in breast cancer treatment guidelines: Development of a quality assessment tool and a systematic review', *Health Expect*.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica, and F. Balkwill. 2008. 'Cancer-related inflammation', *Nature*, 454: 436-44.
- Matsumiya, T., K. Ota, T. Imaizumi, H. Yoshida, H. Kimura, and K. Satoh. 2010. 'Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1', *J Immunol*, 184: 4205-14.
- McGowan, P. M., E. McKiernan, F. Bolster, B. M. Ryan, A. D. Hill, E. W. McDermott, D. Evoy, N. O'Higgins, J. Crown, and M. J. Duffy. 2008. 'ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer', *Ann Oncol*, 19: 1075-81.
- Medcalf, R. L., and S. J. Stasinopoulos. 2005. 'The undecided serpin. The ins and outs of plasminogen activator inhibitor type 2', *Febs j*, 272: 4858-67.
- Merino Bonilla, J. A., M. Torres Tabanera, and L. H. Ros Mendoza. 2017. 'Breast cancer in the 21st century: from early detection to new therapies', *Radiologia*, 59: 368-79.
- Miyamoto, S., M. Hirata, A. Yamazaki, T. Kageyama, H. Hasuwa, H. Mizushima, Y. Tanaka, H. Yagi, K. Sonoda, M. Kai, H. Kanoh, H. Nakano, and E. Mekada. 2004. 'Heparin-binding EGF-like growth factor is a promising target for ovarian cancer therapy', *Cancer Res*, 64: 5720-7.
- Mollica Poeta, V., M. Massara, A. Capucetti, and R. Bonecchi. 2019. 'Chemokines and Chemokine Receptors: New Targets for Cancer Immunotherapy', *Front Immunol*, 10: 379.
- Mørch, L. S., C. W. Skovlund, P. C. Hannaford, L. Iversen, S. Fielding, and Ø Lidegaard. 2017. 'Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer', *N Engl J Med*, 377: 2228-39.
- Muntasell, A., M. Cabo, S. Servitja, I. Tusquets, M. Martínez-García, A. Rovira, F. Rojo, J. Albanell, and M. López-Botet. 2017. 'Interplay between Natural Killer Cells and Anti-HER2 Antibodies: Perspectives for Breast Cancer Immunotherapy', *Front Immunol*, 8: 1544.
- Nagarsheth, N., M. S. Wicha, and W. Zou. 2017. 'Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy', *Nat Rev Immunol*, 17: 559-72.
- Narod, Steven A., Javaid Iqbal, Vasily Giannakeas, Victoria Sopik, and Ping Sun. 2015. 'Breast Cancer Mortality After a Diagnosis of Ductal Carcinoma In Situ', *JAMA Oncology*, 1: 888-96.
- Nitta, H., B. D. Kelly, C. Allred, S. Jewell, P. Banks, E. Dennis, and T. M. Grogan. 2016. 'The assessment of HER2 status in breast cancer: the past, the present, and the future', *Pathol Int*, 66: 313-24.
- Ostuni, M. A., P. Hermand, E. Saindoy, N. Guillou, J. Guellec, A. Coens, C. Hattab, E. Desuzinges-Mandon, A. Jawhari, S. Iatmanen-Harbi, O. Lequin, P. Fuchs, J. J. Lacapere, C. Combadière, F. Pincet, and P. Deterre. 2020. 'CX3CL1 homo-oligomerization drives cell-to-cell adherence', *Sci Rep*, 10: 9069.
- Oyanagi, J., Y. Koh, K. Sato, K. Mori, S. Teraoka, H. Akamatsu, K. Kanai, A. Hayata, N. Tokudome, K. Akamatsu, M. Nakanishi, H. Ueda, and N. Yamamoto. 2019. 'Predictive value of serum protein levels in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with nivolumab', *Lung Cancer*, 132: 107-13.
- Paijens, S. T., A. Vledder, M. de Bruyn, and H. W. Nijman. 2021. 'Tumor-infiltrating lymphocytes in the immunotherapy era', *Cell Mol Immunol*, 18: 842-59.

- Park, M. H., J. S. Lee, and J. H. Yoon. 2012. 'High expression of CX3CL1 by tumor cells correlates with a good prognosis and increased tumor-infiltrating CD8+ T cells, natural killer cells, and dendritic cells in breast carcinoma', *J Surg Oncol*, 106: 386-92.
- Rivas-Fuentes, S., A. Salgado-Aguayo, J. Arratia-Quijada, and P. Gorocica-Rosete. 2021. 'Regulation and biological functions of the CX3CL1-CX3CR1 axis and its relevance in solid cancer: A mini-review', *J Cancer*, 12: 571-83.
- Rojas, K., and A. Stuckey. 2016. 'Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors', *Clin Obstet Gynecol*, 59: 651-72.
- Sanders, Peggy A. Schuyler R.N., William D. Dupont Ph.D., David L. Page M.D. 2005. 'The natural history of low-grade ductal carcinoma in situ of the breast in women treated by biopsy only revealed over 30 years of long-term follow-up', *Cancer*, 103.
- Savas, P., R. Salgado, C. Denkert, C. Sotiriou, P. K. Darcy, M. J. Smyth, and S. Loi. 2016. 'Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic', *Nat Rev Clin Oncol*, 13: 228-41.
- Sawaki, M., T. Shien, and H. Iwata. 2019. 'TNM classification of malignant tumors (Breast Cancer Study Group)', *Jpn J Clin Oncol*, 49: 228-31.
- Schoenborn, J. R., and C. B. Wilson. 2007. 'Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses', *Adv Immunol*, 96: 41-101.
- Schroeder, J. A., and D. C. Lee. 1997. 'Transgenic mice reveal roles for TGF α and EGF receptor in mammary gland development and neoplasia', *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2: 119-29.
- Shen, J., Z. Xiao, Q. Zhao, M. Li, X. Wu, L. Zhang, W. Hu, and C. H. Cho. 2018. 'Anti-cancer therapy with TNF α and IFN γ : A comprehensive review', *Cell Prolif*, 51: e12441.
- Shien, T., and H. Iwata. 2020. 'Adjuvant and neoadjuvant therapy for breast cancer', *Jpn J Clin Oncol*, 50: 225-29.
- Stein, H. 2007. '[The grading of invasive breast cancer according to Elston and Ellis]', *Pathologe*, 28: 307.
- Subik, K., J. F. Lee, L. Baxter, T. Strzepek, D. Costello, P. Crowley, L. Xing, M. C. Hung, T. Bonfiglio, D. G. Hicks, and P. Tang. 2010. 'The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines', *Breast Cancer (Auckl)*, 4: 35-41.
- Sukkar, M. B., R. Issa, S. Xie, U. Oltmanns, R. Newton, and K. F. Chung. 2004. 'Fractalkine/CX3CL1 production by human airway smooth muscle cells: induction by IFN-gamma and TNF-alpha and regulation by TGF-beta and corticosteroids', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287: L1230-40.
- Sun, J., D. M. Li, J. Huang, J. Liu, B. Sun, D. L. Fu, and G. S. Mao. 2017. 'The correlation between the expression of ADAM17, EGFR and Ki-67 in malignant gliomas', *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 21: 4595-99.
- Tardáguila, M., and S. Mañes. 2013. 'CX3CL1 at the crossroad of EGF signals: Relevance for the progression of ERBB2(+) breast carcinoma', *Oncoimmunology*, 2: e25669.
- Tian, T., S. Olson, J. M. Whitacre, and A. Harding. 2011. 'The origins of cancer robustness and evolvability', *Integr Biol (Camb)*, 3: 17-30.
- Tokunaga, R., W. Zhang, M. Naseem, A. Puccini, M. D. Berger, S. Soni, M. McSkane, H. Baba, and H. J. Lenz. 2018. 'CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy', *Cancer Treat Rev*, 63: 40-47.
- Untch, M., and 2007. *Deutsches Ärzteblatt*, 16/2007.
- Valabrega, G., F. Montemurro, and M. Aglietta. 2007. 'Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer', *Ann Oncol*, 18: 977-84.
- Varol, U., Y. Kucukzeybek, A. Alacacioglu, I. Somali, Z. Altun, S. Aktas, and M. Oktay Tarhan. 2018. 'BRCA genes: BRCA 1 and BRCA 2', *J buon*, 23: 862-66.
- Wang, R., J. J. Jaw, N. C. Stutzman, Z. Zou, and P. D. Sun. 2012. 'Natural killer cell-produced IFN- γ and TNF- α induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1', *J Leukoc Biol*, 91: 299-309.

- Wang, R., X. Ye, R. Bhattacharya, D. R. Boulbes, F. Fan, L. Xia, and L. M. Ellis. 2016. 'A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 17 Regulates Colorectal Cancer Stem Cells and Chemosensitivity Via Notch1 Signaling', *Stem Cells Transl Med*, 5: 331-8.
- Wang, Z. 2017. 'ErbB Receptors and Cancer', *Methods Mol Biol*, 1652: 3-35.
- Wojdasiewicz, P., L. A. Poniatowski, A. Kotela, J. Deszczyński, I. Kotela, and D. Szukiewicz. 2014. 'The chemokine CX3CL1 (fractalkine) and its receptor CX3CR1: occurrence and potential role in osteoarthritis', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 62: 395-403.
- Wörmann, B. 2017. 'Breast cancer: basics, screening, diagnostics and treatment', *Med Monatsschr Pharm*, 40: 55-64.
- Xu, Z., D. Guo, Z. Jiang, R. Tong, P. Jiang, L. Bai, L. Chen, Y. Zhu, C. Guo, J. Shi, and D. Yu. 2019. 'Novel HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugates of Trastuzumab Beyond T-DM1 in Breast Cancer: Trastuzumab Deruxtecan(DS-8201a) and (Vic-)Trastuzumab Duocarmazine (SYD985)', *Eur J Med Chem*, 183: 111682.
- Zeng, Y., N. Huebener, S. Fest, S. Weixler, U. Schroeder, G. Gaedicke, R. Xiang, A. Schramm, A. Eggert, R. A. Reisfeld, and H. N. Lode. 2007. 'Fractalkine (CX3CL1)- and interleukin-2-enriched neuroblastoma microenvironment induces eradication of metastases mediated by T cells and natural killer cells', *Cancer Res*, 67: 2331-8.
- Zhang, J., D. Huang, P. E. Saw, and E. Song. 2022. 'Turning cold tumors hot: from molecular mechanisms to clinical applications', *Trends Immunol*, 43: 523-45.
- Zidi, I., S. Mestiri, A. Bartegi, and N. B. Amor. 2010. 'TNF-alpha and its inhibitors in cancer', *Med Oncol*, 27: 185-98.

15 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Nadine Heithorst, erkläre an Eides statt, dass ich die bei der promotionsführenden Einrichtung

der TUM zur Promotionsprüfung vorgelegte Arbeit mit dem Titel:

unter der Anleitung und Betreuung durch: Herr PD Dr. med. Holger Bronger

ohne sonstige Hilfe erstellt und bei der Abfassung nur die gemäß § 7 Abs. 6 und 7 angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

☐ Ich habe keine Organisation eingeschaltet, die gegen Entgelt Betreuer*innen für die Anfertigung von Dissertationen sucht, oder die mir obliegenden Pflichten hinsichtlich der Prüfungsleistungen für mich ganz oder teilweise erledigt.

☐ Ich habe die Dissertation in dieser oder ähnlicher Form in keinem anderen Prüfungsverfahren als Prüfungsleistung vorgelegt.

☐ Teile der Dissertation wurden in _____ veröffentlicht.

☐ Ich habe den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben und bin nicht in einem früheren Promotionsverfahren für den angestrebten Doktorgrad endgültig gescheitert.

☐ Ich habe bereits am _____ bei der promotionsführenden Einrichtung der Hochschule _____ unter Vorlage einer Dissertation _____ mit dem Thema _____

_____ die Zulassung zur Promotion beantragt mit dem Ergebnis:

☐ Ich habe keine Kenntnis über ein strafrechtliches Ermittlungsverfahren in Bezug auf wissenschaftsbezogene Straftaten gegen mich oder eine rechtskräftige strafrechtliche Verurteilung mit Wissenschaftsbezug.

Die öffentlich zugängliche Promotionsordnung sowie die Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und für den Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten der TUM sind mir bekannt, insbesondere habe ich die Bedeutung von § 27 PromO (Nichtigkeit der Promotion) und § 28

PromO (Entzug des Doktorgrades) zur Kenntnis genommen. Ich bin mir der Konsequenzen einer falschen Eidesstattlichen Erklärung bewusst.

Mit der Aufnahme meiner personenbezogenen Daten in die Alumni-Datei bei der TUM bin ich

☐ einverstanden, ☐ nicht einverstanden.