

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg**

**Direktor: Universitäts-Professor Dr. med. Achim Wöckel**

**NK-Zell-vermittelte Dedifferenzierung von Brustkrebszellen  
als neuer Resistenzmechanismus**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Kathrin Becker**

**aus Würzburg**

**Würzburg, Fgl go dgt '4239**

**Referent:**

**Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen**

**(Frauenklinik des Universitätsklinikums Würzburg,  
Sektion für Experimentelle Tumorimmunologie)**

**Koreferent:**

**Priv.-Doz. Dr. Roland Houben**

**(Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
des Universitätsklinikums Würzburg)**

**Dekan:**

**Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

**12.03.2018**

**Die Promovendin ist approbierte Ärztin**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Mammakarzinom</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie, Einteilung, Therapie, Prognose.....	1
<b>1.2</b>	<b>Tumorstammzellen</b> .....	<b>3</b>
1.2.1	Die Tumorstammzellhypothese.....	3
1.2.2	Der Zusammenhang zwischen Tumorstammzellen und Epithelial-mesenchymaler Transition .....	5
1.2.3	Die Bedeutung von Tumorstammzellen für die Entstehung und Prognose des Mammakarzinoms.....	7
<b>1.3</b>	<b>Tumorimmunologie</b> .....	<b>9</b>
1.3.1	Zelluläre Heterogenität des Mammakarzinoms .....	9
1.3.2	Morphologie und Funktionsweise von Natürlichen Killer-Zellen .....	9
1.3.3	„Immune Escape“-Mechanismen von Brustkrebszellen .....	11
<b>1.4</b>	<b>Fragestellungen</b> .....	<b>14</b>
1.4.1	Wie kommt es zur Anreicherung von Brustkrebsstammzellen innerhalb einer Tumorzellpopulation nach dem Kontakt mit NK-Zellen? .....	14
1.4.2	Was deutet auf eine Selektion von Tumorstammzellen hin? .....	14
1.4.3	Können Tumorstammzellen durch NK-Zell-Kontakt „de novo“ entstehen? .....	14
1.4.4	Gibt es Hinweise auf eine NK-Zell-abhängige Stammzellinduktion durch „epithelial-mesenchymale Transition“ (EMT)? .....	15
1.4.5	Worüber wird die Induktion von Tumorstammzellen vermittelt? .....	15
1.4.6	Wie groß ist der Einfluss von Selektion und Induktion zur Tumorstammzellenanreicherung im Vergleich? .....	15
1.4.7	Unterscheiden sich selektionierte und induzierte Tumorstammzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit neue Kolonien (Klone) zu bilden? .....	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>17</b>
2.1.1	Geräte und Verbrauchsmaterial.....	17
2.1.1.1	<i>Geräte</i> .....	17
2.1.1.2	<i>Verbrauchsmaterial</i> .....	19

2.1.2	Chemische und biologische Materialien .....	20
2.1.2.1	Zelllinien.....	20
2.1.2.2	Allgemeine Reagenzien zur Zellkultur.....	21
2.1.2.3	Reagenzien zur NK-Zell-Isolierung.....	23
2.1.2.4	Reagenzien zur Zellseparation.....	23
2.1.2.5	FACS-Reagenzien.....	24
2.1.2.6	Antikörper, Färbemittel und andere Reagenzien zur Zellbehandlung.....	24
2.1.2.7	Reagenzien zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	26
2.1.2.8	Reagenzien und Primer für Quantitative Real-Time-PCR.....	29
2.1.2.9	Sonstiges.....	30
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>31</b>
2.2.1	Zellkultur der Tumorzellen .....	31
2.2.2	Durchflusszytometrischer Nachweis von Tumorstammzellen.....	32
2.2.3	RNA-Isolation aus Tumorzellen und Bestimmung von Genexpressionsmustern mittels quantitativer Real-Time-PCR.....	34
2.2.4	Gewinnung von Effektorzellen .....	37
2.2.4.1	Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut gesunder Spender.....	37
2.2.4.2	Magnetische Aufreinigung von NK-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten ....	38
2.2.4.3	Aktivierung und Expansion der isolierten NK-Zellen .....	39
2.2.5	Kokultur von MCF-7-Zellen und NK-Zellen bzw. Inkubation mit NK-Zell- Überstand .....	40
2.2.6	Nachweise über die Selektion von Tumorstammzellen .....	41
2.2.6.1	Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenexpression von NK-Zell-Liganden auf Brustkrebszellen.....	41
2.2.6.2	Zellsortierung und Bestimmung der mRNA-Expression von NK-Zell-Liganden in MCF-7-Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR .....	42
2.2.7	Nachweise über die Induktion von Tumorstammzellen.....	43
2.2.7.1	Stammzelldepletion und durchflusszytometrischer Nachweis de novo entstandener Tumorstammzellen.....	43
2.2.7.2	RNA-Expression epithelialer und mesenchymaler Marker in MCF-7-Zellen vor und nach Kokultur mit NK-Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR....	43

2.2.7.3	<i>Durchflusszytometrischer Nachweis einer Stammzellinduktion nach Kokultur von MCF-7-Zellen und Concanamycin-behandelten NK-Zellen</i> .....	44
2.2.7.4	<i>Durchflusszytometrische Analyse nach der Kokultur von MCF-7-Zellen und NK-Zellen unter Blockade von NK-Zell-Rezeptoren bzw. MHC1-Molekülen</i> .....	44
2.2.8	Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil selektionierter und induzierter Tumorstammzellen im Vergleich .....	45
2.2.9	Klonogenität von MCF-7-Zellen nach einer Kokultur mit NK-Zellen .....	47
2.2.10	Statistik .....	47
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Nachweis einer Tumorstammzellanreicherung nach der Kokultur von MCF-7-Brustkrebszellen mit NK-Zellen</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2</b>	<b>Inkubation von MCF-7-Brustkrebszellen mit NK-Zell-Überstand erbringt keine Tumorstammzellanreicherung</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3</b>	<b>Hinweise für die Selektion von Tumorstammzellen</b> .....	<b>52</b>
3.3.1	CD44 <sup>high</sup> CD24 <sup>low</sup> -Zellen haben eine veränderte Oberflächenexpression von NK-Zell-Liganden im Vergleich zu CD44 <sup>high</sup> CD24 <sup>high</sup> -Zellen .....	52
3.3.2	CD44 <sup>high</sup> CD24 <sup>low</sup> -Zellen haben eine verminderte RNA-Expression von NK-Zell-Liganden im Vergleich zu CD44 <sup>high</sup> CD24 <sup>high</sup> -Zellen .....	59
<b>3.4</b>	<b>Hinweise für die Induktion von Tumorstammzellen</b> .....	<b>60</b>
3.4.1	Tumorstammzellen können „de novo“ aus Nichtstammzellen entstehen .....	60
3.4.2	EMT: Herunterregulation epithelialer Marker und Hochregulation mesenchymaler Marker von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen .....	61
3.4.3	Ein ineffizienter Kontakt zwischen Tumorzellen und NK-Zellen mittels Concanamycin A führt zu einer erhöhten Stammzellanreicherung .....	63
3.4.4	Tumorstammzell-Induktion wird über NKG2D und DNAM-1 vermittelt .....	65
<b>3.5</b>	<b>Induktion und Selektion sind zwei nebeneinander existierende Mechanismen zur Tumorstammzellanreicherung</b> .....	<b>68</b>
<b>3.6</b>	<b>Bestehende und induzierte Tumorstammzellen besitzen das gleiche klonogene Potential</b> .....	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>72</b>

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>English Summary .....</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>86</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>97</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	

# **1 Einleitung**

## **1.1 Das Mammakarzinom**

### **1.1.1 Epidemiologie, Einteilung, Therapie, Prognose**

Weltweit ist das Mammakarzinom der häufigste maligne Tumor der Frau. In Deutschland beträgt die Inzidenz 72.000 Neuerkrankungen jährlich, 8-10% der Frauen werden im Laufe ihres Lebens ein Mammakarzinom entwickeln [1]. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr mit einem mittleren Erkrankungsalter von 61 Jahren [2]. In der Alterskategorie zwischen 35 und 55 Jahren ist dies die häufigste Todesursache. Dank der Einführung eines flächendeckenden Mammographie-Screenings und erfolgsversprechender Therapiekonzepte liegt die 5-Jahres-Überlebensrate mittlerweile bei 75%.

Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms besteht vor allem bei langem bzw. supraphysiologischem Östrogeneinfluss (frühe Menarche, späte Menopause, Hormonsubstitution in der Postmenopause), Nulliparität, Adipositas, Nikotinabusus, genetischer Disposition (z.B. BRCA1/2) bzw. familiärer Belastung und vielen weiteren Faktoren.

Histologisch gehen 85-90% der Mammakarzinome vom Epithel der Milchgänge aus (duktales Carcinoma in situ / invasives duktales Karzinom), während sich 10-15% aus dem Drüsenepithel entwickeln (lobuläres Carcinoma in situ / invasives lobuläres Karzinom). Zudem existieren seltene Sonderformen, wie das inflammatorische Mammakarzinom und der Morbus Paget der Mamille, sowie Tumore anderen Ursprungs in der Brust.

Durch die klinische und pathologische Einteilung anhand des TNM-Systems („tumor, nodes, metastases“) können Aussagen über Verlauf und Prognose des Mammakarzinoms getroffen werden (sogenanntes „Staging“). Außerdem bildet diese Stadieneinteilung (zusammengefasst UICC I-IV) die Grundlage für die Wahl der Therapieoptionen. Weitere Einflussfaktoren sind die Größe des Primärtumors, welche mit der Metastasierungswahrscheinlichkeit korreliert, bereits erfolgte lymphogene oder hämatogene Metastasierung, der Differenzierungsgrad („Grading“), ein multizentrisches Wachstumsmuster, der Hormonrezeptorstatus (Östrogen-Rezeptoren, Progesteron-Rezeptoren, Her2/neu oder triple-negative Karzinome) und das Patientenalter.

Das primäre, operable Mammakarzinom wird nach Möglichkeit brusterhaltend therapiert

(„BET“, Brusterhaltende Therapie). Dieses Vorgehen beinhaltet die Exstirpation des Primärtumors mit mindestens 10 axillären Lymphknoten zu prognostischen Zwecken („Wide Excision“) gefolgt von einer obligaten Radiatio der Brustwand. Bei unklarem Lymphknotenstatus wird eine „Sentinel-Node-Biopsie“ durchgeführt. Ist der Sentinel-Lymphknoten, der als erste drainierende Station des Lymphabflussgebietes gilt, betroffen, so wird eine radikale Lymphonodektomie in Erwägung gezogen. Eine Mastektomie kommt, ebenso wie die neoadjuvante Bestrahlung, nur noch selten zum Einsatz, wie z.B. bei sehr großen Tumoren, ungünstiger Lokalisation oder Hautinfiltration. Im Anschluss gibt es verschiedene Ansätze für eine adjuvante systemische Therapie. Bei auffälligem Lymphknotenstatus, fraglicher Hormonempfindlichkeit sowie im Prämenopausenstatus werden Zytostatikakombinationen aus Anthrazyklinen, Cyclophosphamid und Taxanen angewandt. Zudem hängt die Therapie vom Subtyp des Karzinoms ab. Bei hormonrezeptor-positiven Tumoren erfolgt eine endokrine Therapie basierend auf Östrogenentzug, welche gute Erfolge bei östrogen- und gestagensensiblen Tumoren zeigt. Standardmedikament ist Tamoxifen, ein selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator. Prämenopausal können jedoch auch Gonadotropin-Analoga sowie die operative ovarielle Ablation herangezogen werden, postmenopausal werden häufig Aromatasehemmer verabreicht [1]. Der monoklonale Antikörper „Trastuzumab“ (Herceptin) kommt bei hoher Her2/neu-Expression des Tumorgewebes zum Einsatz. Mit Pertuzumab steht mittlerweile ein weiterer, HER2-spezifischer Antikörper zur Verfügung, der synergistisch zu Trastuzumab eingesetzt werden kann. Weitere Optionen sind der HER2/neu-spezifische Kinaseinhibitor Lapatinib sowie das Immuntoxin Trastuzumab emtansine (T-DM1). Für den dritten Subtyp, das sogenannte triple-negative Mammakarzinom, das weder Hormonrezeptoren noch HER2/neu exprimiert, steht bislang keine zielgerichtete Therapie zur Verfügung. Erste Ergebnisse aus klinischen Studien deuten aber darauf hin, dass dieser Subtyp (insbesondere bei Vorliegen einer BRCA1/2-Mutation) relativ gut auf eine Hemmung tumorspezifischer DNA-Reparatur-Proteine (z.B. PARP1-Inhibition) [3] sowie auf Immuntherapien (z.B. mit anti-PD1-Antikörpern) anspricht [4].

Die Therapie des metastasierten Mammakarzinoms unterliegt zumeist einer palliativen Zielsetzung. Lokalrezidive sollten operativ entfernt und bestrahlt werden. Fernmetastasen befinden sich typischerweise in Knochen, Lunge, Leber und Hirn. Sie können nur als



solitärer, zugänglicher Herd chirurgisch reseziert werden. Überwiegend wird auf eine palliative systemische Therapie zurückgegriffen, wobei die endokrine Behandlung als besser verträgliche Möglichkeit gegenüber dem Einsatz von Zytostatika Vorrang hat [1]. Auf diese Weise wird derzeit ein mittleres progressionsfreies Überleben von 15 Monaten erreicht [5]. Eine Radiatio ist bei Haut-, Wirbelsäulen- und Hirnmetastasen indiziert [1].

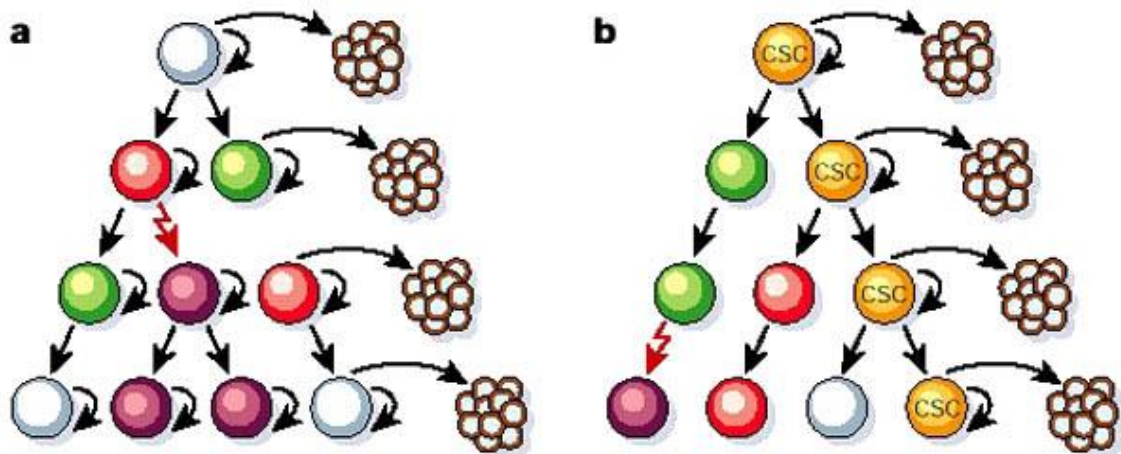
## **1.2 Tumorstammzellen**

### **1.2.1 Die Tumorstammzellhypothese**

Bereits in den 1950er Jahren wurde durch heute undenkbare Versuche am Menschen die Beobachtung gemacht, dass eine Menge von über 1 Million Tumorzellen nötig ist, um nach autologer Injektion in den Oberschenkel ein Tumorwachstum auszulösen [6]. Ähnliche Erkenntnisse erbrachte die subkutane Injektion leukämischer Tumorzellen in Mäuse, von denen nur 1-4% neue Kolonien bildeten [7]. Zur Erklärung, warum nicht jede Tumorzelle allein einen neuen Tumor initiieren kann, wurden zwei Theorien aufgestellt: Das stochastische und das hierarchische Modell der Tumorentstehung.

Das stochastische Modell besagt, dass potentiell jede Tumorzelle einen neuen Tumor auslösen kann, die Wahrscheinlichkeit für den Übertritt in den hierfür notwendigen, proliferierenden Zellzyklus jedoch sehr gering ist.

Im Gegensatz dazu geht das hierarchische Modell von einer funktionellen Heterogenität des Tumors aus, innerhalb dessen nur eine geringe Anzahl an Zellen das Potential besitzt, einen neuen, wiederum funktionell heterogenen Tumor hervorzubringen [6]. Diese wenigen tumorigenen Zellen hätten die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung, welche zugleich elementare Eigenschaften embryonaler bzw. adulter Gewebestammzellen sind [7]. Angesichts des Zusammenhangs zwischen embryonalen Stammzellen und Tumor-initiiierenden Krebszellen wurde die Bezeichnung „Tumorstammzelle“ (TSZ) etabliert. In der Wissenschaft der letzten Jahre hat sich das hierarchische Modell der Tumorentstehung gegenüber dem stochastischen Modell eher durchgesetzt.



**Abb. 1: Stochastisches und hierarchisches Modell der Tumorentstehung [7] (Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis)**

**a:** Das stochastische Modell der Tumorentstehung besagt, dass alle phänotypisch unterschiedlichen Zellen eines Tumors das Potential haben, neue Kolonien zu generieren, die Wahrscheinlichkeit für jede einzelne Zelle jedoch sehr gering ist.

**b:** Das hierarchische Modell der Tumorentstehung geht von einer heterogenen Tumorzellpopulation aus, in der nur eine Untergruppe das Potential zur Bildung neuer Tumoren besitzt. Diese Tumor-initiiierenden Zellen werden Tumorstammzellen („Cancer Stem Cells“, CSC) genannt.

Bonnet und Dick gelang es in den 1990er Jahren erstmals Tumorstammzellen einer myeloischen Leukämie zu identifizieren [8]. Mittlerweile wurden für eine Vielzahl anderer Malignome ebenso Subpopulationen derartiger tumorigener Zellen beschrieben, wie beispielsweise für Hirntumore, Pankreaskarzinome, HNO-Tumoren, Kolonkarzinome und Mammakarzinome. Die Identifizierung und Charakterisierung von Tumorstammzellen erfolgt dabei mittels Xenotransplantationsversuchen, bei denen menschliche Malignomzellen anhand verschiedener Oberflächenmarker sortiert werden und danach getrennt in immundefiziente Mäuse transplantiert werden. So kann „in vivo“ untersucht werden, durch welche Oberflächenmerkmale sich tumorigene Zellen von anderen unterscheiden [9].

Al-Hajj et al. konnten auf diese Weise zeigen, dass auch beim Mammakarzinom eine spezielle Subpopulation Tumor-initiiierender Zellen existiert. Diese Zellen zeichnen sich durch eine hohe Expression des Oberflächenmarkers CD44 und eine gleichzeitig sehr niedrige Expression des Oberflächenmarkers CD24 aus.  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Zellen des Mammakarzinoms besitzen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung sowie zur Differenzierung, welche Grundvoraussetzungen für die Bildung eines neuen, heterogenen Tumors sind [10]. Außerdem zeigen sie nach frischer Kultivierung das charakteristische

Wachstumsmuster einer abgeplatteten Kugel, auch Mammosphäre genannt [11]. Dies belegt ihre Fähigkeit unabhängig von der Verankerung auf einer zellkulturgeeigneten Oberfläche (oder einer anderen extrazellulären Matrix) zu wachsen. Battula et al. postulierten, dass auch GD2 (ein Glykosphingolipid in der Membran einiger Brustkrebszellen) ein Marker für Zellen mit dem Potenzial zur Kolonisierung sei. Diese GD2-positiven Zellen besäßen größtenteils auch das Oberflächenprofil  $CD44^{high}CD24^{low}$  [12]. Aus diesem Grunde werden  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Zellen sowie GD2-positive Zellen als Tumorstammzellpopulation des Mammakarzinoms angesehen.

### **1.2.2 Der Zusammenhang zwischen Tumorstammzellen und Epithelial-mesenchymaler Transition**

Bei der Metastasierung von Tumoren scheinen disseminierte Tumorzellen stammzelltypische Fähigkeiten zur Selbsterneuerung und Differenzierung anzunehmen, um in fremdem Gewebe neue Tumorphpopulationen aufbauen zu können [13]. Die auffallend ähnlichen Charakteristika normaler Stammzellen und Tumorstammzellen gaben Anlass auch andere entwicklungstypische Mechanismen wie die „epithelial-mesenchymale Transition“ (EMT), die die Entstehung von Stammzellen bzw. deren Disseminierung erklären könnten, auf Tumorstammzellen zu übertragen. Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) und der umgekehrte Prozess, genannt mesenchymal-epitheliale Transition (MET), spielen eine zentrale Rolle bei Migrationsprozessen in der Embryogenese. Während der Embryonalentwicklung wandern durch EMT entstandene mesodermale Stammzellen in die Peripherie, um sich dort via MET zu verschiedenen Gewebetypen epithelialer Organe wie Niere oder Ovar zu differenzieren. Epitheliale Zellen besitzen durch ihre basale und apikale Seite ein polarisiertes Erscheinungsbild und ordnen sich mittels haftender Membranstrukturen in organisierten Schichten aneinander. Mesenchymale Zellen dagegen weisen eine spindelförmige Morphologie auf und bilden nur fokale Kontakte untereinander aus. Stattdessen haben sie ein hohes Potential zur Migration [14].

Mani et al. zeigten, dass humane epitheliale Brustdrüsenzellen, die eine EMT durchlaufen haben, Eigenschaften von Stammzellen annehmen. Diese mesenchymal transdifferenzierten Zellen bilden bis zu 40-fach mehr Mammosphären als native epitheliale Zellen und weisen eine phänotypische  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Expression auf.

Zudem wurde festgestellt, dass sowohl Brustdrüsenzellen nach EMT als auch durchflusszytometrisch selektionierte CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen der nativen Brustdrüsenpopulation die gleichen EMT-assoziierten Genveränderungen aufweisen. Dabei handelt es sich vor allem um eine verminderte Expression von E-Cadherin, einem epithelialen Adhäsionsmolekül zum Aufbau fester Zell-Zell-Kontakte, und um eine vermehrte Expression von N-Cadherin, welches als mesenchymales Membranprotein nach dem Kontakt zu anderen Zellen Migration und Invasion auslöst. Die Expression weiterer Marker wie mesenchymaler Zytoskelettelemente (Vimentin, Fibronectin) und EMT-auslösender Transkriptionsfaktoren (FOXC2, Snail, Twist, SIP1, Slug) ist ebenso vermehrt nachweisbar. Dieser mesenchymale Stammzellstatus ist reversibel, sodass nach wenigen Tagen ohne Stimulus wieder die heterogene Zellzusammensetzung der Ausgangspopulation vorherrscht.

EMT ist also ein Mechanismus zur Induktion von Zellen mit Stammzeleigenschaften. Gleichzeitig besitzen Stammzellen von sich aus mesenchymale Eigenschaften. Diese Erkenntnisse lassen sich auf neoplastische Brustdrüsenzellen übertragen [13].

Desweiteren wurden erhöhte EMT-Marker auch für kollektiv zirkulierende Tumorzellen („Circulating Tumor Cells“, CTC) im Blut von Brustkrebspatientinnen gefunden. Die Menge an zirkulierenden Tumorzellen korreliert mit der Wahrscheinlichkeit für Metastasierung und Rezidive [15].

In den letzten Jahren erforschten Wissenschaftler verschiedene Signalwege zur Übermittlung einer EMT. Als Auslöser fanden sich der Kontakt zu Bestandteilen der Extrazellulärmatrix (Kollagen, Hyaluronsäure) oder zu löslichen Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), FGF (Fibroblast Growth Factor), EGF (Epidermal Growth Factor) und SH/HGF (Scatter Factor/Hepatocyte Growth Factor) [14]. Auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und IFN- $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ), ein immunmodulatorisches Zytokin im Rahmen der Tumorbekämpfung, sowie andere Entzündungsmediatoren können eine EMT von Tumorzellen hervorrufen [16]. Die weitere Signalübertragung geschieht über membrangebundene Rezeptoren, die eine Aktivierung bestimmter Transkriptionsfaktoren (FOXC2, Snail, Twist, SIP1, Slug) anregen, welche wiederum Zielmechanismen wie die Herunterregulation von E-Cadherin oder anderer epithelialer Eigenschaften bestimmen [14]. Diese mesenchymale Transdifferenzierung scheint jedoch nur inkomplett stattzufinden, da epitheliale Oberflächenstrukturen in geringem

Ausmaß erhalten bleiben.

Letztendlich wirft die EMT ein kritisches Licht auf das hierarchische Modell der Tumorentstehung, da ein Tumor sein Wachstum nicht nur durch die wenigen ortsansässigen Gewebestammzellen aufrechterhält, sondern auch durch die EMT differenzierter Epithelzellen neue Tumorstammzellen generieren kann [16].

### **1.2.3 Die Bedeutung von Tumorstammzellen für die Entstehung und Prognose des Mammakarzinoms**

Der Ursprung von Tumorstammzellen als Grundlage für die Auslösung eines Mammakarzinoms ist noch nicht vollständig geklärt. Eine Möglichkeit ist die Mutation einer adulten Gewebestammzelle zur Tumorstammzelle, die die Basis für ein heterogenes Tumorstammwachstum bildet. Ein anderer Mechanismus ist die EMT-gesteuerte Umwandlung differenzierter neoplastischer Brustdrüsenzellen zu Tumorstammzellen, die dann die Proliferation des Tumorgewebes aufrechterhalten. Beide Wege sind Gegenstand gegenwärtiger Forschung.

Da Tumorstammzellen ein hohes Potential zur Selbsterneuerung besitzen und als multipotente Vorläuferzellen für die Gewebedifferenzierung zuständig sind, stellen sie die treibende Kraft für Tumorstammwachstum und Progression dar [17]. Bestehenden Beschreibungen zufolge existiert innerhalb von Tumoren eine sogenannte „Tumorstammzellnische“, in der diese Tumorstammzellpopulation durch ein zytokinreiches Mikromilieu relativ geschützt vor angreifenden Immunzellen reguliert und aufrechterhalten wird [18]. Dort liegen die Tumorstammzellen hauptsächlich in Quieszenz, in einem mitotisch inaktiven Ruhezustand, vor, welcher sie vor zellzykluswirksamen Zytostatika und anderen Noxen schützt. Nicht zuletzt deshalb zeichnen sich Tumorstammzellen durch eine starke Resistenz gegenüber Umwelteinflüssen sowie therapeutischen Maßnahmen aus. Sie exprimieren überdies eine hohe Rate an Aldehyd-Dehydrogenase (ALDH), einem Enzym zur Antioxydation und Entgiftung. Aktive „ATP binding cassette“-Transporter (ABC-Transporter) in großer Anzahl ermöglichen eine weitreichende Arzneimitteleliminierung [17]. So geht die Behandlung des Mammakarzinoms mit den leitliniengerecht eingesetzten Chemotherapeutika Paclitaxel und Epirubicin zwar mit einer drastischen Reduktion der Haupttumormasse einher, jedoch auch mit einem vorwiegenden Überleben der

CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen [19]. Auch eine endokrine Therapie mit Tamoxifen oder Fulvestrant bei positivem Hormonrezeptorstatus führt zur Anreicherung von Tumorstammzellen [20]. Der Einsatz von Trastuzumab und NK-Zellen im Rahmen einer Antikörper-vermittelten Zelltoxizität („antibody-dependent cellular cytotoxicity“, ADCC) bei Her2-positiven Tumoren resultiert ebenso in einer vergrößerten Stammzellpopulation [21]. Hinzu kommt, dass Tumorstammzellen auch weniger anfällig gegenüber ionisierender Strahlung sind, zum Beispiel im Rahmen einer adjuvanten Radiatio nach brusterhaltender Therapie. Diese Tatsache lässt sich unter anderem durch die übermäßige Produktion von DNA-Reparatur-Enzymen erklären [16].

In der Zusammenschau sind diese Überlebensvorteile von Tumorstammzellen entscheidende Gefahren für die Formation von Rezidiven nach augenscheinlicher Remission.

Der vor allem durch EMT generierte mesenchymale Phänotyp begünstigt außerdem die Migration, Invasion und Angiogenese von Tumorstammzellen, was zu deren Disseminierung in periphere Organe führt. Diese Eigenschaften sind die Voraussetzung für die Bildung neuer Kolonien im Rahmen von Rezidiven und vor allem von Metastasen, welche als größter Faktor für die Mortalität von Brustkrebspatientinnen anzusehen sind [17]. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Brustkrebspatientinnen mit Fernmetastasen liegt bei weniger als 25%. Im Vergleich dazu beträgt sie für Patientinnen mit rein lokalisiertem Befund über 95% [2].

Nebenbei haben sich weitere Risikofaktoren als prognostisch ungünstig herausgestellt, da sie mit einem erhöhten Tumorstammzellanteil einhergehen. Dazu zählen ein positiver Her2/neu-Rezeptorstatus, der bei 15-20% aller Mammakarzinome Ausprägung findet, aber auch Triple-negative Tumoren (ER negativ, PR negativ, Her2/neu negativ) und BRCA1-assoziierte familiäre Mammakarzinome zeichnen sich durch vermehrte Tumorstammzellen und eine schlechtere Prognose aus [17].

Zusammenfassend scheinen Tumorstammzellen das Triebwerk für die Aufrechterhaltung, Progression und Mortalität des Mammakarzinoms zu sein und damit die Überlebenszeit und Lebensqualität dieser Patientinnen zu bestimmen.

### **1.3 Tumorimmunologie**

#### **1.3.1 Zelluläre Heterogenität des Mammakarzinoms**

Ein Tumor ist ein heterogenes Gebilde, das nicht nur aus entarteten Zellen besteht. Neben den eigentlichen Tumorzellen (einschließlich der Tumorstammzellsubpopulation) bilden mesenchymale Stammzellen, Fibroblasten, Myofibroblasten, Endothelzellen und infiltrierende Immunzellen das Tumorstroma. Über Wachstumsfaktoren und Zytokine finden komplexe Interaktionen innerhalb dieses Tumormikromilieus statt. Mesenchymale Stammzellen stimulieren die Tumorzellen zur Selbsterneuerung und können sich zu Adipozyten oder Fibroblasten differenzieren. Fibroblasten haben die Aufgabe Bestandteile der Extrazellulärmatrix (Prokollagene und Glykosaminoglykane) zu synthetisieren. Über TGF- $\beta$  und andere Wachstumsfaktoren veranlassen sie zudem die Proliferation, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen. Endothelzellen tragen vor allem zur Angiogenese (Gefäßneubildung) des Tumors bei, welche dessen Energieversorgung sicherstellt und ihn zu weiterem Wachstum und Metastasierung befähigt. Immunzellen wie Dendritische Zellen, Makrophagen, T-Zellen und Natürliche Killer-Zellen, üben sowohl stimulierende als auch inhibierende Einflüsse (im Rahmen der Eliminierung) auf Tumorzellen aus. Andersrum können auch die eigentlich malignen Tumorzellen Immunzellen anlocken und so modulieren, dass eine tumorfreundliche Umgebung entsteht. Auf diesem Wege kann der Tumor sich selbst eine schützende Stammzellnische erschaffen [18]. Interessanterweise existieren viele Parallelen zwischen den zell- bzw. zytokingesteuerten Vorgängen des Tumorwachstums und der Wundheilung. Schon 1986 postulierte der Wissenschaftler H.F. Dvorak, ein Tumor sei eine Wunde, die nicht heile [22].

Die heterogene Zellzusammensetzung des Mammakarzinoms ist also sehr unbeständig und unterliegt einem komplex interagierendem Netzwerk [18].

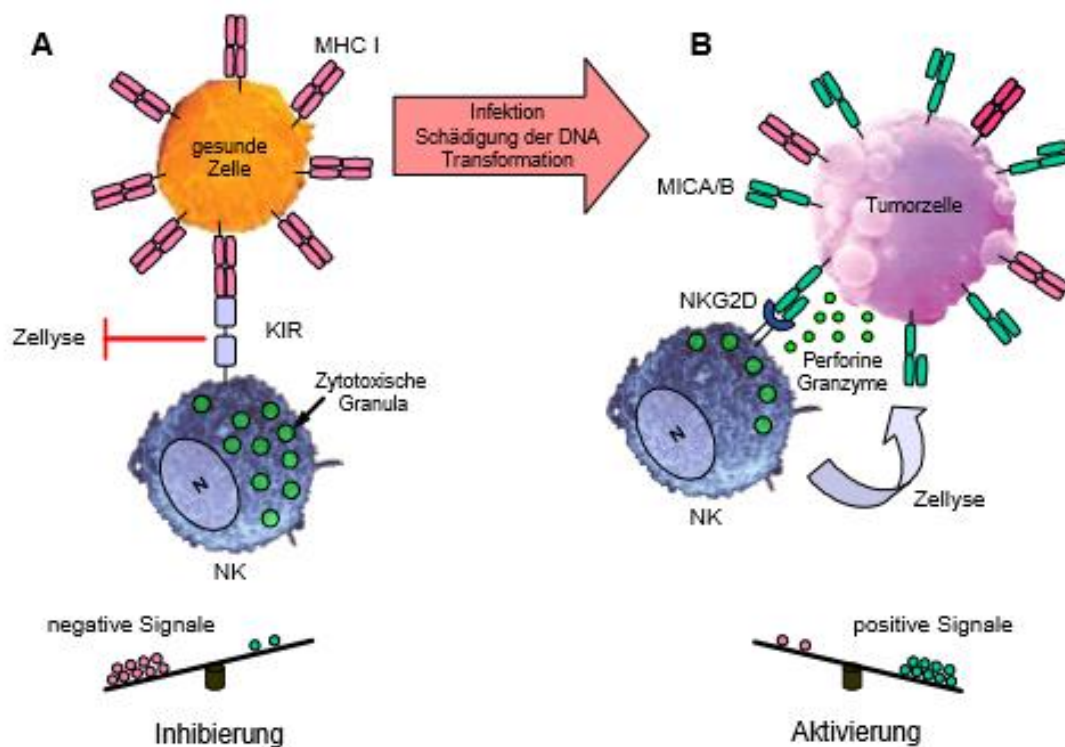
#### **1.3.2 Morphologie und Funktionsweise von Natürlichen Killer-Zellen**

Beim Mammakarzinom stellen NK-Zellen den Hauptteil der tumorinfiltrierenden Immunzellen dar. Als Bestandteil der angeborenen Immunabwehr können sie schnell und antigenunabhängig zwischen normalen und veränderten Körperzellen unterscheiden. Dieser Erkennungsprozess geschieht durch die Integration aktivierender und inhibierender Signale, die über verschiedene Oberflächenrezeptoren registriert werden

[23]. Die dabei zustande kommende Verbindung zwischen Immun- und Effektorzelle wird als „immunologische Synapse“ bezeichnet. Gemäß der „Missing Self Hypothese“ nach K. Kärre [24] dienen die inhibitorischen Rezeptoren auf der NK-Zell-Oberfläche, die hauptsächlich aus der Familie der „killing immunoglobulin receptors“ (KIR) stammen, der Interaktion mit MHC1-Molekülen (Major histocompatibility Complex Class 1), welche jede gesunde Körperzelle exprimiert. Das Fehlen oberflächlicher MHC1-Moleküle (Missing Self) und die Hochregulation anderer Oberflächenproteinen (Induced Self), wie es zum Beispiel bei entarteten oder virusinfizierten Zellen der Fall ist, führt zum Überwiegen aktivierender Signale, was die NK-Zell-abhängige Lyse der Zielzelle auslöst. Zu den wichtigsten aktivierenden Rezeptoren gehören die „natural cytotoxicity receptors“ (NCR3/NKp30, NCR2/NKp44 und NCR1/NKp46), und vor allem der C-Typ-Lektin-Rezeptor NKG2D. NKG2D bindet an die Liganden MICA und MICB (MHC class 1 chain related gene A/B) sowie an die UL16-Bindeproteine ULBP1-4 auf Tumorzellen [23]. Da ULBP4 ausschließlich in der Haut vertreten ist, wurde es für die Versuche dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt [25]. Ein relevanter Koaktivator auf NK-Zellen ist DNAM-1 (CD226), der an die tumorassoziierten Oberflächenstrukturen CD112 (Nectin 2) und CD155 („polio virus receptor“, PVR) bindet [23]. NK-Zellen sind zudem über die Expression des Fc $\gamma$ -Rezeptors CD16 an der antikörpervermittelten zellulären Zytotoxizität (ADCC) beteiligt. So werden sie zu Effektoren von zielgerichteten Therapieansätzen wie beispielsweise dem Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab bei positivem Her2/neu-Rezeptorstatus.

Sobald eine Körperzelle als „nicht normal“ erkannt wurde, beginnt die NK-Zelle mit der Sekretion zytotoxischer Enzyme. Perforine setzen durchlässige Poren in die Membran der Zielzelle, sodass eindringende Granzyme die Apoptose auslösen können. Desweiteren sezernieren aktivierte NK-Zellen Zytokine wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) und GM-CSF („granulocyte macrophage colony-stimulating factor“), die weitere Immunzellen (T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten) anlocken bzw. aktivieren. Auf diese Weise gelten sie als Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort. Außer durch den Kontakt mit veränderten Körperzellen können NK-Zellen durch die Interleukine 2 und 12 stimuliert werden. Diese werden hauptsächlich von ortsansässigen Dendritischen Zellen freigesetzt. Wir nutzten IL-2 für die NK-Zell-Aktivierung in *in vitro*-Versuchen.





**Abb. 2: Immunologische Synapse, Missing-Self- und Induced-Self-Hypothese [26] (Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis)**

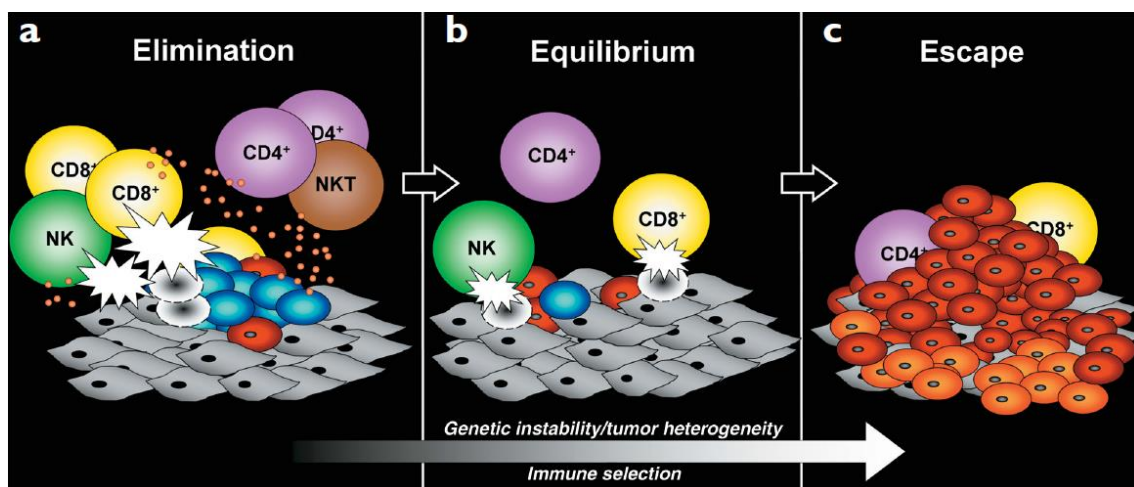
Der Aktivierungszustand einer NK-Zelle ist abhängig von der Summe inhibierender und aktivierender Signale, die sie aus ihrem Umfeld durch Interaktion mit anderen Zellen erhält. **A** Inhibierende Signale via MHC1 (z.B. KIR-Rezeptoren) blockieren positive Signale von aktivierenden Rezeptoren (z.B. NKG2D/DNAM1). **B** Missing Self / Induced Self: Das Fehlen inhibitorischer Signale (MHC1) und die Hochregulation aktivierender NKG2D-Liganden auf der Zielzelle bewirken die Aktivierung der NK-Zelle. [27]

Epidemiologische Erhebungen deuten darauf hin, dass Tumoren vermehrt in Patienten mit verminderter NK-Zell-Aktivität entstehen [28]. NK-Zellen sind also essentiell für die Tumorbekämpfung und Immunsurveillance des Mammakarzinoms. Talerico et alia demonstrierten, dass insbesondere die Anwesenheit von Brustkrebsstammzellen zur Induktion von NK-Zell-Expansion und -Aktivierung führt. Daraus ergebe sich eine verminderte hämatogene Metastasierung [29]. Ergo stehen NK-Zellen in ständiger Wechselwirkung mit anderen Immunzellen sowie mit den Tumorzellen selbst [23].

### 1.3.3 „Immune Escape“-Mechanismen von Brustkrebszellen

Tumorzellen unterliegen der Immunsurveillance. Somit überleben bevorzugt diejenigen Zellen, die Mechanismen entwickelt haben um dem Immunsystem auf unterschiedlichste

Art und Weise zu entkommen. Einige dieser Mechanismen wurden bereits beschrieben. Vor wenigen Jahren stellten Dunn et al. fest, dass das Immunsystem nicht nur eine protektive Rolle im Tumorgeschehen spielt, sondern auch im Stande ist, weniger immunogene Tumorzellen zu übergehen und damit zu selektionieren. Sie nannten den Vorgang „Immunoediting“ und teilten ihn in drei Phasen ein. Im Anfangsstadium eliminieren Immunzellen immunogene Tumorzellen. Dadurch findet eine aktive Selektion auf Tumorzellen mit geringer Immunogenität statt, die vom Immunsystem nicht erkannt werden. Nach einer Phase des Equilibriums, in der sich Tumoreliminierung und Tumorevasion die Waage halten, dominieren die schwach immunogenen Tumorzellen und entziehen sich letztendlich dem Immunsystem. Dies führt zur Entstehung eines resistenten Tumors, der von körpereigenen Abwehrzellen toleriert wird. Demnach verliert das Immunsystem im Laufe der Tumorentwicklung seine eliminierende Wirkung und kann von einem zunächst wachstumshemmenden zu einem nunmehr wachstumsfördernden Faktor für den Tumor werden [30].



**Abb. 3: Tumormicroenvironment nach Dunn et al. (2002) [30] (Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis)**

In der Anfangsphase des Tumorwachstums überwiegt die Eliminierung der transformierten Zellen durch das Immunsystems (**a**). Dabei werden jedoch Tumorzellen selektioniert, die weniger immunogen sind und daher vom Immunsystem nicht erkannt werden. In dieser Phase des Equilibriums gleichen sich Tumorwachstum und -eliminierung aus (**b**). Im fortgeschrittenen Stadium können sich die selektionierten, wenig immunogenen Tumorzellen vermehren und dem Immunsystem entgehen (**c**). [30].

Für das Mammakarzinom wurde die verminderte Expression relevanter, immunogener Oberflächenantigene als Ergebnis eines Immunoediting-Prozesses beschrieben. Dazu gehören die Herunterregulation von MHC1-Molekülen [31], des

Wachstumshormonrezeptors Her2/neu [21] sowie der NK-Zell-Rezeptoren MICA und MICB [32]. Diese weniger immunogenen Tumorzellen haben bessere Überlebenschancen als andere Tumorzellen und können innerhalb des Tumors weiterhin selektioniert werden. Es zeigte sich auch, dass eine verminderte Expression von NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen mit einer erhöhten Rezidivrate einhergeht [33]. Einige Tumorzellen scheinen diese durch Autophagie zu resorbieren [34], andere sind sogar in der Lage, ihre oberflächlichen Liganden, zum Beispiel die NK-Zell-Liganden MICA und MICB, abzuwerfen, die dann als lösliche Faktoren (soluble MICA/B, sMICA/B) NK-Zellen abfangen können.

Abgesehen von der Selektion phänotypisch veränderter Tumorzellen existieren diverse andere Mechanismen zur Förderung der Tumortoleranz durch das Immunsystem. Tumorzellen selbst initiieren die Reorganisation ihres Mikromilieus. Das geschieht zum Beispiel durch die Sekretion von TGF- $\beta$ , welches (auch bei entzündlichen Vorgängen) vielseitige immunsuppressive Wirkungen auf Abwehrzellen hat [35]. Auch das „EGF-like domain-containing protein 7“ (Egfl7) wird von Tumorzellen ausgeschüttet. Es sorgt für die Herunterregulation von Leukozytenadhäsionsmolekülen in der Wand von tumorversorgenden Blutgefäßen. Für Immunzellen ist es so schwieriger in Tumorregionen einzudringen, um dort zu agieren [36]. Außerdem scheinen Tumorzellen vermehrt regulatorische T-Zellen anzulocken, die wiederum (eigentlich zum Ausschalten autoimmuner Prozesse) eine inhibierende Wirkung auf andere Immunzellen ausüben. B- und T-Zellen zeigten schlechtere Überlebensraten nach Tumorzellkontakt. Auch ein direkter Einfluss auf NK-Zellen wurde ermittelt. Die Proliferation von NK-Zellen nach dem Kontakt zu Tumorzellen war deutlich eingeschränkt. [37], genau wie ihr Potential Zielzellen zu lysieren. Die unzulängliche Zytotoxizität der NK-Zellen ist vor allem durch ihre verminderte Expression der aktivierenden Oberflächenrezeptoren NKG2D und DNAM-1 nach Tumorzellkontakt zu erklären. Interessanterweise sind diese Veränderungen reversibel durch die Blockade von TGF $\beta$ , MICA/B und anderen Faktoren [23]. Zudem wurden in Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom anhand spezifischer Oberflächenstrukturen zwei neue NK-Zell-Untergruppen entdeckt, die sich durch Unreife und mangelnde Zytotoxizität auszeichnen [38].

Für Tumorstammzellen sind, neben ihrem allgemein durchsetzungsfähigen Phänotyp, auch Resistenzen gegenüber Immunzellen beschrieben worden. So weisen sie, als

Produkt eines Immunoediting-Prozesses, eine verminderte Anzahl angreifbarer Oberflächenantigene auf [31] und können ebenso Immunzellen selbst beeinflussen [37]. Insbesondere ein vermehrtes Überleben nach dem Kontakt zu T-Zellen [34] und nach Antikörper-vermittelter NK-Zell-Lyse (ADCC) [21] wurde offensichtlich. Da sowohl diese antiimmunogenen Eigenschaften als auch die eigentliche Formation von Tumorstammzellen mit EMT-assoziierten Veränderungen einhergehen, kann die EMT selbst als aktiver „Immune Escape“-Mechanismus verstanden werden [31].

## **1.4 Fragestellungen**

### **1.4.1 Wie kommt es zur Anreicherung von Brustkrebsstammzellen innerhalb einer Tumorzellpopulation nach dem Kontakt mit NK-Zellen?**

Zentraler Punkt meiner Arbeit ist die Erforschung von Mechanismen, die dazu führen, dass Brustkrebsstammzellen einer Immunantwort durch NK-Zellen entkommen können. Als Antwort auf diese Frage habe ich zwei Hypothesen aufgestellt:

- 1.) Die Brustkrebsstammzellen sind durch negative Selektion übrig geblieben.
- 2.) Die Brustkrebsstammzellen sind durch Induktion von Stammzeleigenschaften aus bereits weiter differenzierten Tumorzellen hervorgegangen.

### **1.4.2 Was deutet auf eine Selektion von Tumorstammzellen hin?**

Ein selektives Killing durch NK-Zellen könnte vor allem durch eine unterschiedliche Expression von Oberflächenproteinen auf den Brustkrebszellen erklärt werden. Dazu untersuchten wir die Expression von NK-Zell-aktivierenden NKG2D-Liganden (*MICA/B*, *ULBP1-3*) und DNAM-1-Liganden (*CD112*, *CD155*) auf Brustkrebsstammzellen und Nichtstammzellen sowie die Expression von NK-Zell-inhibierenden klassischen und nicht-klassischen MHC1-Molekülen.

### **1.4.3 Können Tumorstammzellen durch NK-Zell-Kontakt „de novo“ entstehen?**

Um die Neuentstehung bzw. Induktion von Tumorstammzellen durch den Kontakt mit NK-Zellen zu belegen, prüften wir, ob aus einer stammzelldepletierten Tumorzellpopulation ( $CD44^{\text{high}}/CD24^{\text{high}}$ -Zellen) nach einer Kokultur mit NK-Zellen neue Tumorstammzellen hervorgehen können.

#### **1.4.4 Gibt es Hinweise auf eine NK-Zell-abhängige Stammzellinduktion durch „epithelial-mesenchymale Transition“ (EMT)?**

Ursache für die Induktion, also die Neuentstehung, von Brustkrebsstammzellen könnte eine sogenannte „Epitheliale Mesenchymale Transition“ (EMT) sein, also die Entwicklung von mesenchymalen Zellen aus ehemals epithelialen Zellen, welche physiologisch vor allem in der Embryogenese eine große Rolle spielt. Diese mesenchymal-transdifferenzierten Zellen könnten dann Eigenschaften von Tumorstammzellen annehmen [16]. Um eine mögliche NK-Zell-induzierte EMT festzustellen, analysierten wir die Expression epithelialer Oberflächenstrukturen (*E-Cadherin*) und mesenchymaler Marker, wie Elemente des Zytoskeletts (*Vimentin*), einige Transkriptionsfaktoren, die eine EMT induzieren können (*Slug, Snail, Twist*) [13] bzw. in der Embryonalzeit von Bedeutung sind (*Oct4, KLF4 und cMyc*) [39].

#### **1.4.5 Worüber wird die Induktion von Tumorstammzellen vermittelt?**

Zunächst beabsichtigten wir das anteilige Verhältnis von Selektion und Induktion näher einzuschätzen, indem wir den Selektionsvorteil von Tumorstammzellen, bedingt durch ihre verminderte Expression von NK-Zell-Liganden, bei einem Killing-Angriff durch NK-Zellen verhinderten. So betrachteten wir die Stammzellbildung unter Ausschaltung der lysierenden Fähigkeit von NK-Zellen durch Concanamycin A mit der Erwartung eines geringeren Prozentsatzes an Tumorstammzellen. Die weitaus höhere Tumorstammzell-Menge im Vergleich zur Anreicherung nach dem Kontakt mit unbehandelten NK-Zellen, ließ darauf schließen, dass es bestimmte Faktoren geben müsste, die eine Induktion auslösen. Dies könnte der veränderte Zell-Zell-Kontakt unter Concanamycin A sein, sowie die damit verbundenen Interaktionen über die NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1, die wir näher ins Auge fassten.

#### **1.4.6 Wie groß ist der Einfluss von Selektion und Induktion zur Tumorstammzellenanreicherung im Vergleich?**

Der Erkenntnis zufolge, dass Selektion und Induktion von Brustkrebsstammzellen zwei nebeneinander existierende Mechanismen sind, stellten wir das anteilige Verhältnis selektionierter und induzierter Tumorstammzellen nach dem Kontakt mit NK-Zellen dar.

#### **1.4.7 Unterscheiden sich selektionierte und induzierte Tumorstammzellen hinsichtlich ihrer Fähigkeit neue Kolonien (Klone) zu bilden?**

Im Allgemeinen wird Stammzellen die Fähigkeit zugeschrieben, neue Tochterzellen und damit neue Kolonien bilden zu können. Außerdem wurde für NK-Zell-resistente Tumorzellen ein sphäroidales Wachstumsmuster beschrieben, was der Formation entstehender Kolonien entspricht [21]. Wir testeten, inwiefern diese Tumorigenität sowohl auf immunresistente als auch auf induzierte Brustkrebsstammzellen zutrifft.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

##### 2.1.1.1 Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller bzw. Vertreiber</b>
ABI PRISM 7500 Sequence Detection System	Applied Biosystems Foster City, CA 94404, USA
Autoklav	H&P Labortechnik AG, 85764 Oberschleißheim, Deutschland
Brutschrank	Thermo Electron GmbH, 63303 Dreieich, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL 60061, USA
Excel (Computersoftware)	Microsoft, Redmond, Washington, USA
FACSCalibur	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, USA
FACSVantage	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, USA
Gelelektrophoresekammer	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Gefrierschränke	Liebherr, 88400 Biberach an der Riß, Deutschland  Thermo Electron GmbH 63303 Dreieich, Deutschland  Philipp Kirsch GmbH 77608 Offenburg, Deutschland

Heizwasserbad	Julabo, 77960 Seelbach, Deutschland
Inkubationsschüttler	New Brunswick Scientific, Eppendorf Enfield, CT, USA
Kühlschrank	Liebherr, 88400 Biberach an der Riß, Deutschland
Magnetrührer	VWR, 64295 Darmstadt, Deutschland
Mikroskop	Leica, 35606 Solms, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
Photometer	Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Probenschüttler (Vortex)	VWR, 64295 Darmstadt, Deutschland
Saugpumpe	Vacuubrand (Brand GmbH & Co KG) 97877 Wertheim, Deutschland
Sterilbank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stickstofftank	Air Liquide, 40235 Düsseldorf, Deutschland
Summit (Computersoftware)	Beckman Coulter, Inc. Fullerton, Kalifornien, USA
Thermocycler (für Reverse Transkription, cDNA-Kontroll-PCR)	Biometra GmbH 37079 Göttingen, Deutschland
Waage	Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland



Zählkammer (Neubauer improved)	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland  Jouan/Thermo Electron GmbH, 63303 Dreieich, Deutschland

### 2.1.1.2 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller bzw. Vertreiber
Drei-Wege-Hahn mit Schlauch	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
FACS Röhrchen	Hartenstein, 97078 Würzburg, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Filterpipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, 51588 Nürmbrecht, Deutschland
Handschuhe	Cardinal Health, Dublin, OH 43017, Irland  Sempermed, 1031 Wien, Austria
Injektionskanüle	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, Dänemark
LS-Säulen (MACS-Kit, 25LS)	Miltenyi Biotec, 51429 Bergisch-Gladbach, Deutschland

Mikroprobengefäße (Eppendorf Cups)	Greiner bio-one, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Multipipettendosiersystem (Combitips)	Eppendorf, 22339 Hamburg, Deutschland
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co KG 97877 Wertheim, Deutschland
Perfusorspritzen (50 ml)	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt, 51588 Nürnbrecht, Deutschland
Zellsiebe (Porengröße 40 µm)	Falcon, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, Massachusetts, USA
Taqman-Platten (96-well)	Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Transwell	Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one, 72636 Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturplatten (2-well, 6-well, 12-well, 24-well, 96-well)	TPP, 8219 Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	TPP, 8219 Trasadingen, Schweiz

## 2.1.2 Chemische und biologische Materialien

### 2.1.2.1 Zelllinien

Zelllinie	Spezies	Herkunft
BT-474	Human, MammaCa	ATCC, Manassas, VA 20110-2209, USA

MCF-7	Human, MammaCa	ATCC, Manassas, VA 20110-2209, USA
MCF-7 6x-selected (MCF-7, die sechs Angriffe durch NK-Zellen und Trastuzumab überlebt haben)	Human MammaCa	Von Dr. Florian Reim Frauenklinik, Uni Würzburg Deutschland
MDA-MB-231	Human, MammaCa	ATCC, Manassas, VA 20110-2209, USA
NK-Zellen (eigene Isolation)	Human, Blood	Gesunde Spender, Deutschland
SK-BR-3	Human, MammaCa	ATCC, Manassas, VA 20110-2209, USA

### 2.1.2.2 Allgemeine Reagenzien zur Zellkultur

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
<b>Medien und Medienzusätze</b>	
Cellgro SCGM	CellGenix GmbH 79108 Freiburg, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM-F12)	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, 12247 Berlin, Deutschland

Natrium-Pyruvat	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (RPMI 1640)	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
<b>Puffer und Lösungen</b>	
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS)	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
<b>Mittel zur Zellablösung (Detachments)</b>	
Accutase	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
Trypsin EDTA	PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
<b>Medium</b>	
Einfriermedium	70% FCS, 20% Standardmedium, 10% DMSO
Standardmedien für...	
BT-474	88,5% DMEM, 10% FCS, 1% P/S, 0,5% Natriumpyruvat
MCF-7 und SK-BR-3	88,5% RPMI 1640, 10% FCS, 1% P/S, 0,5% Natriumpyruvat
MDA-MB-231	88,5% DMEM-F12, 10% FCS, 1% P/S, 0,5% Natriumpyruvat
NK-Zellen	89% Cellgro, 10% FCS, 1% P/S, 0,5 µl/ml Interleukin-2 (=500 IU/ ml)

### 2.1.2.3 Reagenzien zur NK-Zell-Isolierung

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
<b>Antikoagulanzen</b>	
ACD-A (Natriumcitrat-Dextrose-Lösung)	Haemonetics Corporation Braintree, MA 02184-9114, USA
<b>Trennlösung</b>	
Biocoll Trennlösung	Biochrom 12247 Berlin, Deutschland
<b>Kommerzielle Kits</b>	
MACS NK Cell Isolation Kit human	Miltenyi Biotec, 51429 Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS NK Cell Activation / Expansion Kit	Miltenyi Biotec, 51429 Bergisch Gladbach, Germany
<b>Puffer:</b>	
MACS Puffer: PBS + 2 mM EDTA	
<b>Zytokine:</b>	
Interleukin 2 (IL-2)	PeproTech GmbH 22085 Hamburg, Germany

### 2.1.2.4 Reagenzien zur Zellseparation

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
<b>Kit</b>	
MACS Magnetic beads cell separation system	Miltenyi Biotec, 51429 Bergisch Gladbach, Deutschland

### 2.1.2.5 FACS-Reagenzien

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
Beriglobin-Lösung	Novartis GmbH & Co. KG, 35041 Marburg, Deutschland
FACS-Puffer: 98% PBS + 2% FCS	S.o. Medien und Medienzusätze
FACS Clean	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, USA
FACS Flow	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, USA
FACS Rinse	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ 07417, USA

### 2.1.2.6 Antikörper, Färbemittel und andere Reagenzien zur Zellbehandlung

Reagenz	Spezies	Label	Verdün- nung	Quelle
<b>Unspezifisch</b>				
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)		-	10ng/ml (3/200µl)	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-human IgG1 (Isotypantikörper)	Maus	-	1mg/ml (1:100)	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-human IgG1 (Isotypantikörper)	Maus	FITC	1:100	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland
Anti-human IgG1 (Isotypantikörper)	Maus	PE	1:100	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland
Anti-human IgG2a (Isotypantikörper)	Maus	-	1:100	Dako, Glostrup, Dänemark

Anti-human IgG2a (Isotypantikörper)	Maus	APC	1:100	Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland
Cell Proliferation Dye eFluor 670				eBioscience, San Diego, CA, USA
Concanamycin A				Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas 75220, USA
Kristallviolett				Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Sekundär-PE		-	1:500	Jackson, Immuno Research, West Grove, PA, USA
<b>Spezifisch</b>				
Anti-human CD24 (SWA11)	Maus	FITC	2mg/ml (1:1000)	Prof. P. Altevogt, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Deutschland
Anti-human CD44	Maus	PE		AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Anti-human CD44	Maus	APC	6,25µg/ ml (1:50)	BioLegend San Diego, CA, USA
Anti-human CD112 (Nectin 2)	Maus	PE	1:5	Immunotech SAS Beckman Coulter Marseille, Frankreich
Anti-human CD155 (PVR)	Maus	-	1:20	Immunotech SAS, Beckman Coulter Marseille, Frankreich
Anti-human CD226 (DNAM-1)	Maus, IgG1	-	10 µg/ml (1:100)	AbD Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Anti-human CD314 (NKG2D)	Maus, IgG1	-	10 µg/ml (1:100)	BioLegend San Diego, CA, USA

Anti-human MHC1 (Klon W6/32)	Maus, IgG1	-	12 µg/ml (1:2)	Prof. Stevanovic, Uni Tübingen, Deutschland
Anti-human MICA	Maus IgG1	-	1 mg/ml (1:50)	BAM O MAB Gräfelfing, Deutschland
Anti-human MICA	Maus IgG2a	-	1 mg/ml (1:50)	BAM O MAB Gräfelfing, Deutschland
Anti-human ULBP1	Maus IgG2a	-	1 mg/ml (1:50)	BAM O MAB Gräfelfing, Deutschland
Anti-human ULBP2	Maus IgG1	-	1 mg/ml (1:50)	BAM O MAB Gräfelfing, Deutschland
Anti-human ULBP3	Maus IgG1	-	10 µg/ml (1:100)	BAM O MAB Gräfelfing, Deutschland

#### 2.1.2.7 Reagenzien zur RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
1 M Magnesiumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
3 M Natriumacetat pH 5,5 / pH8	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
6x Loading Dye	Fermentas UAB, Thermo Scientific CT-02241 Vilnius, Lithuania
Agarose	Fermentas, Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA
Chloroform	Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland
Doppelt destilliertes Wasser	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland



Diethylcarbonat (DEPC)	Merck Millipore Darmstadt, Deutschland
Diisopropanol	Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland
DNase 1	Fermentas, Thermo Scientific Waltham, Massachusetts, USA
EDTA	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
Ethanol (70%, 75%, 100%)	Klinikapotheke, Uni Würzburg, Deutschland
Formaldehyd (37%)	Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland
Gel Red	Biotium Hayward, CA 94545, USA
3-( <i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure (MOPS)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	AppliChem GmbH Darmstadt, Deutschland
TAE-Puffer (1x) (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer)	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland PEQLAB
TriFast	peqlab Biotechnologie GmbH 91052 Erlangen, Deutschland
<b>Kits:</b>	
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Hercules, Kalifornien, USA
Crimson Long Amp Taq DNA Polymerase Kit	NEB Ipswich, Massachusetts, USA
<b>Primer:</b>	

$\beta$ -Actin (frw/rev)	Sigma Aldrich Deisenhofen, Deutschland
--------------------------	---

### 2.1.2.8 Reagenzien und Primer für Quantitative Real-Time-PCR

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, 34212 Melsungen, Deutschland
<b>Kit:</b> ABsolute QPCR SYBR Green LOW Rox Mix	ABgene Rochester, NY 14610, USA

Primer	Sequenz	Herkunft
β-Actin frw	5'-TGTTTGAGACCTTCAACACCC-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
β-Actin rev	5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'	
18S frw	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
18S rev	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	
GAPDH frw	5'-ACCCAGAAGACTGTGGATGG-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
GAPDH-rev	5'-TCTAGACGGCAGGTCAGGTC-3'	
MICA frw	5'-CCTTGGCCATGAACGTCAGG-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MICA rev	5'-CCTCTGAGGCCTCACTGCG-3'	
MICA frw	5'-ACCTTGGCTATGAACGTCACA-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
MICA rev	5'-CCCTCTGAGACCTCGCTGCA-3'	
ULBP1 frw	5'-GTACTGGGAACAAATGCTGGA-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ULBP1 rev	5'-AACTCTCCTCATCTGCCAGCT-3'	
ULBP2 frw	5'-TTACTTCTCAATGGGAGACTG-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ULBP2 rev	5'-TGTGCCTGAGGACATGGCGA-3'	
ULBP3 frw	5'-CCTGATGCACAGGAAGAAGA-3'	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
ULBP3 rev	5'-TATGGCTTTGGGTTGAGCTAA-3'	
CD112 frw	5'-CCTCTGCATCTCCAAAGAGG-3'	Genomic Oligo San Diego, CA, USA
CD112 rev	5'-CACAGGTATCAGGGCTGGTT-3'	

CD155 frw	5'-CTACACCTGCCTGTTTCGTCA-3'	Genomic Oligo
CD155 rev	5'-GGTCTGAGTGCCAGGTGATT-3'	San Diego, CA, USA
Ecad-5	5'-TGCCCAGAAAATGAAAAAGG -3'	Sigma, Deisenhofen,
Ecad-3	5'-GTGTATGTGGCAATGCGTTC -3'	Deutschland
Vim frw	5'-GAGAACTTTGCCGTTGAAGC-3'	Sigma, Deisenhofen,
Vim rev	5'-GCTTCCTGTAGGTGGCAATC-3'	Deutschland
Snail frw	5'-CCTCCCTGTCAGATGAGGAC -3'	Sigma, Deisenhofen,
Snail rev	5'-CCAGGCTGAGGTATTCCTTG -3'	Deutschland
Twist frw	5'-GGAGTCCGCAGTCTTACGAG-3'	Sigma, Deisenhofen,
Twist rev	5'-TCTGGAGGACCTGGTAGAGG -3'	Deutschland
Slug frw	5'-GGGGAGAAGCCTTTTTCTTG-3'	Sigma, Deisenhofen,
Slug rev	5'-TCCTCATGTTTGTGCAGGAG-3'	Deutschland
Oct4 frw	5'-CTGGGTTGATCCTCGGACCT-3'	Sigma, Deisenhofen,
Oct4 rev	5'-CCATCGGAGTTGCTCTCCA-3'	Deutschland
KLF4 frw	5'-GTGCCCCGACTAACCGTTG-3'	Sigma, Deisenhofen,
KLF4 rev	5'-GTCGTTGAACTCCTCGGTCT-3'	Deutschland
cMyc frw	5'-CCACAGCAAACCTCCTCACA-3'	Sigma, Deisenhofen,
cMyc rev	5'-GCAGGATAGTCCTTCCGAGT-3'	Deutschland

### 2.1.2.9 Sonstiges

Reagenz	Hersteller bzw. Vertreiber
<b>Desinfektionsmittel</b>	
Cutasept	BODE Chemie GmbH & Co. KG 22525 Hamburg, Deutschland
Ethanol	Klinikapotheke, Uni Würzburg, Deutschland

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur der Tumorzellen**

Für die durchgeführten Versuche verwendeten wir Brustkrebszellen der Linien MCF-7, SKBR-3, BT-474 und MDA-MB-231. MCF-7 6x selected -Zellen sind MCF-7-Zellen, die sechs Selektionszyklen mit Trastuzumab und NK-Zellen überlebt haben. Sie weisen einen etwas höheren Anteil an Tumorstammzellen auf als native MCF-7-Zellen [21].

Die Tumorzellen wurden zur Lagerung in Einfriermedium aufgenommen und in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Dazu wurden 1-2 Millionen Tumorzellen in 1,5 ml Einfriermedium, bestehend aus 70% FCS, 20% Standardmedium und 10% DMSO (zur Verhinderung von Kristallbildung) in einem Kryoröhrchen langsam heruntergekühlt und tiefgefroren. Um gefrorene Tumorzellen wieder in Kultur zu nehmen, wurde das entsprechende Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und in der Hand vorgewärmt. Unter sterilen Bedingungen wurden einige Tropfen vorgewärmtes Nährmedium zugefügt und solange resuspendiert, bis eine flüssige Zellsuspension entstanden ist. Diese wurde in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt und in 4 ml warmes Nährmedium aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren bei 1500 rpm für 5 min bei Raumtemperatur setzte sich am Boden des Röhrchens ein Pellet ab. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette und Saugpumpe abgezogen, um den Zellen das Einfriermedium gänzlich zu entziehen. Das Zellpellet wurde dann wiederum in wenige Milliliter Standardmedium aufgenommen und resuspendiert, bis alle Zellen gelöst waren. Anschließend konnte die Tumorzellsuspension in Zellkulturflaschen geeigneter Größe, die mit dem passenden Volumen an Medium aufgefüllt wurden (kleine Flasche 5 ml, mittlere Flasche 13 ml, große Flasche 25 ml), ausgesät werden und zur Inkubation im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  liegend verwahrt werden.

Nach wenigen Stunden wuchsen die Tumorzellen adhärent und standen unter regelmäßiger mikroskopischer Beobachtung. Um optimale Wachstumsverhältnisse zu gewährleisten, mussten die Zellen, wenn nahezu der komplette Flaschenboden von einem dichten Zellrasen bewuchert war, geteilt (gesplittet) werden. Dazu wurde zunächst sämtliches Medium mit den darin enthaltenen abgestorbenen Zellen abgesaugt. Anschließend wurden die noch adhären Zellen mit 5 ml PBS gespült, um jegliches im Medium enthaltene FCS zu eliminieren, da es die proteolytische Wirkung der Enzyme zum Ablösen der Zellen hemmen würde. Das PBS wurde sofort wieder abgesaugt. Je nach

Größe der Kulturflasche wurde dann 0,5-1 ml der proteolytisch wirkenden Enzyme durch Schwenken auf dem Flaschenboden verteilt und diese für 5-10 Minuten in den Brutschrank zurückgegeben. Diese Enzyme greifen unter anderem die oberflächlichen Adhäsionsmoleküle der Tumorzellen an und bewirken so die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden. Normalerweise wurde dazu Trypsin EDTA, eine Kombination aus Protease und Chelatbildner, eingesetzt. Vor Verwendung der Zellen für einen FACS-Versuch kam Accutase, eine Mischung aus vorwiegend kollagenolytischen Enzymen, zum Einsatz. Dieses Verfahren beeinflusst die Oberflächenstrukturen der Tumorzellen weitaus weniger, da Accutase spezifischer angreifende Enzyme als Trypsin enthält. Nachdem sich alle Zellen vom Flaschenboden gelöst hatten, wurde die Wirkung der Enzyme durch die Zugabe von 4 ml FCS-haltigem Standardmedium gestoppt. Nun konnte die Zellsuspension erneut in Kulturflaschen verteilt werden oder nach Zentrifugation und Absaugen des Überstands zur Langzeitlagerung in Einfriermedium aufgenommen werden bzw. für Versuche verwendet werden.

Zur Bestimmung der exakten Zellzahl wurden die abgelösten Zellen auf ein definiertes Gesamtvolumen verdünnt. Davon wurden 10 µl im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gefärbt und in eine Kammer der "Neubauer improved"-Zählkammer gegeben. Zur Minimierung der Fehlergröße wurden zwei verschiedene 4x4-Quadrate große Felder ausgezählt und diese Anzahl an Zellen mit den gezählten Feldern, dem Mischverhältnis, dem Zählkammerfaktor und dem Volumen verrechnet, sodass eine relativ genaue Gesamtzellzahl ermittelt werden konnte.

### **2.2.2 Durchflusszytometrischer Nachweis von Tumorstammzellen**

Um die Subpopulation von Tumorstammzellen quantitativ von der Gesamtpopulation abzugrenzen, nutzten wir die durchflusszytometrische Darstellung von Zellen anhand der Oberflächenmarker CD24 und CD44. Tumorstammzellen werden phänotypisch als CD24<sup>low</sup>/CD44<sup>high</sup> beschrieben, wohingegen Nichtstammzellen sowohl eine hohe CD44- als auch eine CD24-Expression aufweisen [10].

Die FACS-Analyse („Fluorescence-assisted Cell Sorting“) basiert auf der Emission bestimmter optischer Signale einer Zelle beim Passieren eines Laserstrahls. Dabei werden die Zellen in kleinen Flüssigkeitstropfen einzeln in eine Kapillare gezogen und vom Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm angestrahlt. Die Intensität der Fluoreszenz wird

detektiert und in elektronische Signale umgewandelt. Die Vorwärtsstreuung des Lichts (FSC = Forward scatter) ist proportional zur Größe der Zelle, während die Seitwärtsstreuung (SSC = Side scatter), die im 90°-Winkel detektiert wird, ein Maß für deren Granularität ist. Außerdem kann über weitere Kanäle verschieden gefiltertes Licht mit bestimmter Wellenlänge zur Differenzierung fluoreszenzmarkierter Zellen genutzt werden. So können bis zu vier unterschiedliche Oberflächenstrukturen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper detektiert werden. Da sich die Bereiche der Wellenlängen für die zu detektierenden Fluoreszenz-Antikörper geringfügig überschneiden, musste eine Kompensation erfolgen. Die Auswertung der durchflusszytometrischen Messung erfolgte über das Computerprogramm „Summit“, mit dem die Verteilung der Zellen in Dot Plots oder Histogrammen dargestellt und bearbeitet werden können.

Soweit möglich wurde 7-Aminoactinomycin (7-AAD) eingesetzt, ein Stoff, der avitale Zellen anfärbt, indem er über Zellmembrandefekte eindringt und deren DNA interkaliert. Bei der Verwendung von NK-Zellen wurden diese, zur besseren Abgrenzung, zuvor mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff („Cell Proliferation Dye eFluor 670“) gefärbt, der im APC-Kanal detektiert werden konnte. Dazu wurde die benötigte Menge an NK-Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen, um jegliches Serum zu entfernen. Anschließend wurden sie in einer 5 µM Färbelösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Der Färbeporgang wurde durch die Zugabe des 4- bis 5-fachen Volumen kalten, FCS-haltigen Mediums gestoppt und die Suspension 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Medium waren die gefärbten NK-Zellen einsatzbereit.

Für eine FACS-Färbung wurden die Tumorzellen (MCF-7-Zellen) mit Accutase vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, um die für die Untersuchung wichtigen Oberflächenstrukturen weitestgehend zu schonen. Alle folgenden Versuchsschritte fanden bei 4°C bzw. auf Eis statt. Nach dem Waschen mit FACS-Puffer und dem Zentrifugieren bei 1800 rpm über 5 Minuten wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf den Tumorzellen mittels Beriglobin (Immunglobulin G des Menschen) oder Kaninchen-Serum geblockt. Diese IgGs binden unspezifisch an die Fc-Rezeptoren der Zelloberfläche, welche sonst die spezifisch eingesetzten Färbeantikörper abfangen würden. Dazu wurde das Pellet in 50 µl Blocking-Lösung pro 1 Million Zellen aufgenommen, die Suspension auf mehrere FACS-Röhrchen je nach Bedarf verteilt und

15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Waschung mit 200 µl FACS-Puffer und eine Zentrifugation bei 1800 rpm über 5 Minuten. Der Überstand wurde durch vorsichtiges Umdrehen und Beklopfen der FACS-Röhrchen entfernt. Nun erfolgte die spezifische Färbung der Tumorzellen. Dabei verwendeten wir die fluoreszenzgekoppelten Antikörper CD24-FITC (SWA11) und CD44-PE sowie deren Isotypen IgG1-FITC und IgG1-PE. Das Zellpellet wurde in jeweils 50 µl Volumen bestehend aus FACS-Puffer und Antikörper im angegebenen Verhältnis aufgenommen. Um eine konstante Konzentration und Verteilung der Antikörper zu gewährleisten, wurden sowohl der Behälter mit dem Antikörper vor dessen Entnahme als auch die zu messende Probe auf dem Probenschüttler kräftig durchmischt. Es folgte eine Inkubation der Proben über 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln, damit die Antikörper ihre fluoreszierenden Eigenschaften behielten. Nach dem zweifachen Abwaschen überschüssiger Antikörper mit 200 µl FACS-Puffer und der folgenden Zentrifugation von wiederum 1800 rpm über 5 Minuten wurden die fluoreszenzmarkierten Zellen in 200 µl FACS-Puffer mit darin enthaltenem 7-Aminoactinomycin aufgenommen. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am FACS-Calibur mit einer Mindestanzahl von 20.000 zu analysierenden Zellen, die vor jedem Messvorgang auf dem Probenschüttler durchmischt wurden. Anhand des Computerprogramms „Summit“ konnten *Gates* gesetzt werden, um tote Zellen und Zelltrümmer (kleiner FSC und SSC, 7-AAD positiv) auszuschließen und Stammzellen (CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>) oder andere Zellpopulationen einzugrenzen. So konnte der Anteil an Tumorstammzellen, auch im Anschluss an verschiedene Vorbehandlungen der Tumorzellen, graphisch ermittelt werden.

### **2.2.3 RNA-Isolation aus Tumorzellen und Bestimmung von**

#### **Genexpressionsmustern mittels quantitativer Real-Time-PCR**

Die Bestimmung von Genexpressionsmustern erfolgte durch die Isolation von Tumorzell-RNA, die in cDNA umgewandelt und anschließend durch eine Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) amplifiziert und quantifizierbar gemacht wurde. Die relative RNA-Expression lässt auf den Produktionszustand der Zelle schließen.

Zunächst wurde das Tumorzell-Pellet in 1 ml TriFast pro 5-10 Millionen Zellen resuspendiert, in ein Mikroprobengefäß überführt und 5 Minuten bei Raumtemperatur



inkubiert. TriFast ist eine Lösung, die Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol enthält, was Zellen gleichzeitig lysiert sowie RNasen und andere Enzyme inaktiviert. Da RNA sehr anfällig ist, die sie abbauenden RNasen jedoch stabil und ubiquitär vorhanden sind, wurde mit großer Sorgfalt gearbeitet. Es wurden Einweghandschuhe getragen, Pipettierspitzen eigens für den Gebrauch von RNA verwendet und RNase-freies, Diethylpyrocarbonat (DEPC) enthaltendes Wasser benutzt. Anschließend wurde das Lysat unter Schütteln mit Chloroform extrahiert und 15 Minuten bei 12.000 g und 4°C zentrifugiert. Es bildeten sich drei übereinander liegende Schichten, wovon die unterste, rote Phase Phenol-Chloroform enthielt, die weiße Interphase aus DNA und Proteinen bestand und aus der oberen, wässrigen Phase die RNA gewonnen werden konnte. Diese RNA wurde mit Isopropanol präzipitiert, mit 75%-igem Ethanol gewaschen und das RNA-Pellet anschließend an der Luft trocknen gelassen. Es wurde aufgenommen in DEPC-H<sub>2</sub>O.

Es folgte der DNA-Verdau durch das Enzym DNase I und die RNA-Konzentrierung mittels Ethanol.

Über eine spektralphotometrische Messung konnte die Menge und Reinheit der gewonnenen RNA überprüft werden. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren wird bei einer Wellenlänge von 260 nm erreicht. Anhand der dabei gemessenen optischen Dichte (Extinktion) wurde die RNA-Konzentration mithilfe folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = OD (260 \text{ nm}) \times \text{Verdünnungsfaktor} (0,1) \times \text{RNA-Faktor} (40)$$

Die Reinheit wurde berechnet durch die Formel

*Reinheit = maximale RNA-Extinktion (260 nm) / maximale Protein-Extinktion (280 nm).*

Sie lag im Normbereich um 2.

Die RNA-Integrität konnte über eine Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert werden. Für ein 1%iges Agarosegel wurden 0,5 g Agarose mit 36 ml DEPC-H<sub>2</sub>O aufgekocht. Nach Abkühlung auf ca. 70°C wurden 5 ml 10x MOPS-Puffer (bestehend aus 200 mM MOPS, 80 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, ad 500 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O, pH7), 9 ml Formaldehydlösung (37%) sowie 2 µl GelRed zugegeben und das Gel gegossen. Nach Aushärtung wurde die Elektrophorese-Kammer mit 1x MOPS-Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurden 0,5 µg RNA in 12 µl Formaldehyd und 6x Ladepuffer 5 Minuten lang bei 70°C denaturiert, auf Eis abgeschreckt und dann auf das Gel geladen. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V über 45 Minuten. Unter UV-Licht konnte das

Ergebnis beurteilt werden. Eine starke 28S-rRNA-Bande und eine etwas schwächere 18S-rRNA-Bande unterhalb sprachen für eine intakte RNA und gute Qualität.

Um die RNA in der Polymerasekettenreaktion einsetzen zu können, musste sie zunächst in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden, welche stabil und amplifizierbar ist. Dies geschieht durch das Enzym „Reverse Transkriptase“, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Wir benutzten dafür das „iScript cDNA Synthesis Kit“ von Bio-Rad. Die Reaktion lief im Thermocycler nach folgendem Schema ab: 5 min bei 25°C, 30 min bei 42°C, 5 min bei 85°C.

Anschließend wurde eine konventionelle cDNA-Kontroll-PCR mit  $\beta$ -Actin als Primer durchgeführt, einem Haushaltsgen, das in jeder Zelle vertreten ist. Dazu benutzten wir das „Crimson Long Amp Taq DNA Polymerase Kit“ von NEB mit einem Reaktionsschema von 35 Zyklen (initial 3 min bei 94°C, 30 sec bei 94°C, 30 sec bei 60°C, 45 sec bei 72°C, 10 min bei 72°C und 4°C – hold). Für die anschließende Elektrophorese stellten wir ein Gel aus 100 ml TAE-Puffer (1x) (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) mit 1,5% Agarose und 3  $\mu$ l GelRed her, beluden es mit 10  $\mu$ l des cDNA-Produktes sowie 2  $\mu$ l 6x Ladepuffer und starteten den Vorgang bei 80 V über 20 Minuten. War der Nachweis über die entstandene cDNA erfolgreich, konnte sie in der quantitativen Real-Time-PCR zur Amplifikation spezifischer Gene eingesetzt werden. Die Zwischenlagerung von cDNA erfolgte im Gefrierschrank bei -20°C.

Die quantitative Real-Time-Polymeraseketten-Reaktion (quantitative PCR, qRT-PCR) ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung von DNA und deren Quantifizierung anhand von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Als Kit benutzten wir das „Absolute QPCR SYBR Green LOW Rox Mix“ von ABgene. Es enthält eine thermostabile DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), ausreichend Desoxyribonucleosidtriphosphate, die Bausteine für den von der DNA-Polymerase synthetisierten DNA-Strang, und den Fluoreszenzfarbstoff „SYBR Green 1“, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Durch Taqman-Sonden könnte das Detektionsverfahren noch in seiner Spezifität gesteigert werden. Zusammen mit dem jeweiligen Primer für einen bestimmten Genabschnitt (in 1  $\mu$ M Konzentration) wurde dieser Mix auf eine 96-Well-Taqman-Platte pipettiert. Um die Fehlerquelle gering zu halten, wurden Filterpipettierspitzen benutzt und Duplikate angelegt, deren Messwerte weniger als 0,5 Zyklen divergieren sollten. Außerdem legten wir für jedes Primerpaar

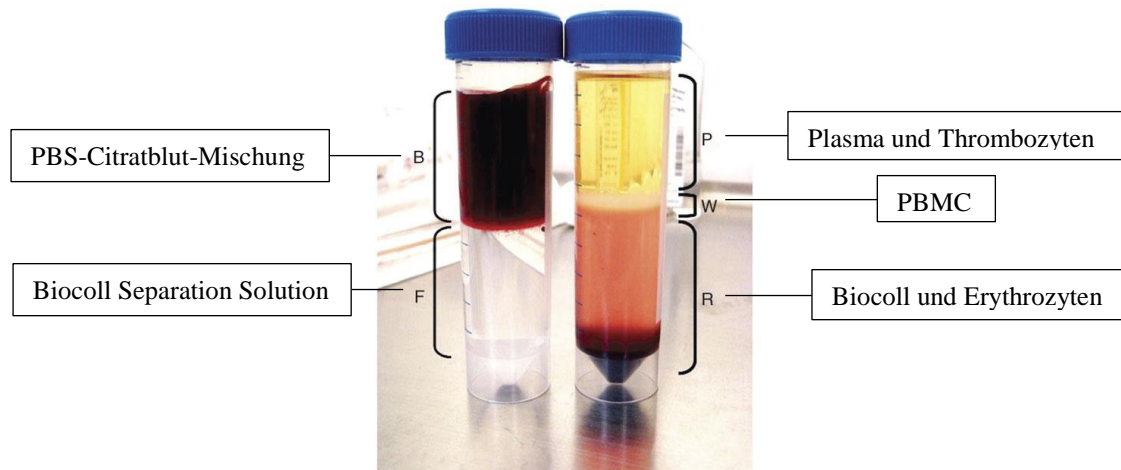
eine Kontrolle mit speziell gereinigtem Wasser (Aqua ad iniectabilia) an. Als Referenz wurde eine 18S-RNA-Sequenz gewählt. Im "ABI PRISM 7500 Sequence Detection System" durchliefen die vorbereiteten Proben 40 Amplifikationszyklen mit einem Temperaturprogramm für die Denaturierung (15s bei 95°C), die Primerhybridisierung (1 min bei 60°C) und die Elongation der DNA. Die Auswertung der genetischen Analyse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Excel. Ein Ct-Wert (*Cycle Threshold*, Schwellenwert-Zyklus) wurde ermittelt. Er gibt den Punkt an, in dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrundwert ansteigt. Je nach Menge der amplifizierten DNA wird dieser Ct-Wert früher oder später erreicht, was anhand der jeweiligen  $\Delta$ Ct-Werte der Dissoziationskurven und deren Relation zur 18S-Referenz verglichen werden konnte. Dieses Verhältnis wurde als „Relative Genexpression“ ( $E = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) berechnet und graphisch dargestellt.

## **2.2.4 Gewinnung von Effektorzellen**

### **2.2.4.1 Isolierung peripherer mononukleärer Zellen (PBMC) aus Vollblut gesunder Spender**

Zur Gewinnung peripherer Blutlymphozyten wurden ausschließlich gesunde erwachsene Spender herangezogen und alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen und Raumtemperatur durchgeführt. Mittels Injektionskanüle und Perfusorspritze wurden dem Spender 45 ml Vollblut entnommen und mit 5 ml (10%) Citrat (ACD-A) zur Antikoagulation versehen. Dieses Citratblut wurde dann im Verhältnis 1:3 auf ein Volumen von 150 ml mit PBS verdünnt. In vier 50 ml-Falcon-Röhrchen wurden je 15 ml Biocoll-Separationslösung vorgelegt. Das ist eine Polysaccharidlösung mit einer definierten Dichte von 1,077 g/ml, die es durch eine Dichtegradientenzentrifugation erlaubt, wässrige Lösungen in ihre unterschiedlichen Bestandteile aufzutrennen. Auf diese Biocoll-Lösung wurde jeweils ein Viertel der PBS-Citratblut-Mischung vorsichtig aufgeschichtet, sodass sich die beiden Phasen nicht miteinander vermischten. Zunächst erfolgte eine Zentrifugation bei 600 rpm über 20 Minuten mit sehr niedriger Beschleunigung und ohne Bremse. Danach wurden aus jedem Röhrchen die obersten 5 ml abgesaugt, um die Thrombozyten zu entfernen. Die folgende Zentrifugation lief bei 1400 rpm über 30 Minuten, ebenfalls mit sehr niedriger Beschleunigung und ohne Bremse. Nun sollten sich die peripheren mononukleären Blutzellen in einer dünnen

weißen Schicht über der Biocoll-Lösung abgesetzt haben, während sich ganz oben das Plasma und unten die Erythrozyten befinden.



**Abb. 4: Gewinnung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation [40] (bearbeitet, Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis)**

PBS-Citratblut-Mischung mit Biocoll Separation Solution vor Zentrifugation (**links**) und nach Zentrifugation (**rechts**). Die zu gewinnenden PBMC setzen sich als weiße Phase zwischen dem Plasma mit darin enthaltenen Thrombozyten und der Biocoll-Erythrozyten-Mischung ab.

Die weiße Phase mit den darin enthaltenen PBMC der vier Röhrcchen konnte mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt werden und in zwei frischen 50 ml-Röhrcchen gepoolt werden. Zum Waschen der Zellen wurden die Röhrcchen mit PBS aufgefüllt und zunächst bei 1800 rpm über 8 Minuten mit eingeschalteter Beschleunigung und Bremse zentrifugiert, um ein Pellet zu erhalten. Im zweiten Waschgang wurden die Pellets der zwei Röhrcchen mit jeweils 10 ml PBS resuspendiert und in einem gemeinsamen Röhrcchen gepoolt, das wieder mit PBS aufgefüllt wurde. Mittels “Neubauer improved”-Zählkammer wurde die genaue Anzahl PBMC bestimmt, die bei einem Ausgangsvolumen von 50 ml Citratblut meistens um die 100 Millionen PBMC lag. Während der anschließenden Zentrifugation bei diesmal 1000 rpm über 8 Minuten wurden die Zellen zur weiteren Verarbeitung auf 4°C heruntergekühlt.

#### **2.2.4.2 Magnetische Aufreinigung von NK-Zellen aus peripheren Blutlymphozyten**

Zur Isolierung von NK-Zellen aus PBMC wurde das “MACS NK Cell Isolation Kit human” verwendet (MACS = “magnetic activated cell sorting”). Das Prinzip dieses Kits beruht auf einer negativen Selektion, indem alle peripheren Blutlymphozyten außer NK-Zellen mit magnetischen Beads markiert und über ein magnetisches Feld depletiert

werden. So bleiben unmarkierte NK-Zellen übrig und stehen zur Kultivierung und Expansion zur Verfügung. Die einzelnen Arbeitsschritte erfolgten alle bei 4°C. Zunächst wurde das Pellet der PBMC in 30-40 µl MACS-Puffer mit 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail pro 10<sup>7</sup> Zellen resuspendiert und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Desweiteren wurde eine Mischung aus 30 µl MACS-Puffer mit 20 µl Anti-Biotin Microbeads pro 10<sup>7</sup> Zellen zugefügt, resuspendiert und nochmals über 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nachdem nun alle PBMC außer den NK-Zellen magnetisch markiert sein sollten, wurden die Zellen mit dem 10-20-fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und bei 300 g über 10 Minuten zentrifugiert, um die übrigen freien Antikörper und Microbeads zu entfernen. Daraufhin konnten sie in 500 µl MACS-Puffer aufgenommen werden, auf eine vorgespülte LS-Separationssäule pipettiert und im magnetischen Feld aufgereinigt werden. Übrig blieben die NK-Zellen, die durch 3-faches Spülen der Säule mit jeweils 3 ml MACS-Puffer herausgewaschen wurden und in einem 15 ml-Falcon-Röhrchen aufgefangen wurden. Mittels “Neubauer improved”-Zählkammer konnte so eine Anzahl von 5-10 Millionen isolierter NK-Zellen, also 5-10% der Ausgangszellzahl, ermittelt werden.

#### **2.2.4.3 Aktivierung und Expansion der isolierten NK-Zellen**

Zur Aktivierung und Expansion der erhaltenen NK-Zellen wurde das “MACS NK Cell Activation/Expansion Kit” verwendet. Dabei werden die NK-Zellen mit Beads-beladenen Antikörpern gegen die Oberflächenproteine CD335 (NKp46) und CD2 versehen, die zur Aktivierung jener beitragen. Diese Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Als Medium wurde Cellgro SCGM mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 500 IU/ml Interleukin 2 eingesetzt. Das darin enthaltene Interleukin 2 trägt ebenso zur Aktivitäts- und Proliferationssteigerung der Zellen bei. Die NK-Zell-Suspension wurde zunächst bei 1700 rpm über 6 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 950 µl Cellgro-Medium pro 10<sup>6</sup> Zellen aufgenommen und mit 50 µl gewaschener und Microbead-beladener CD335/CD2-Antikörper-Suspension pro 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert. Die so aktivierten NK-Zellen konnten in einer 24-Well-Platte mit je 1 ml Zellsuspension, also ca. 1 Million Zellen pro Loch, ausgesät werden. Die NK-Zell-Kultur wurde täglich unter dem Mikroskop beurteilt. Nach 6 Tagen sollten clusterförmige Kolonien deutlich erkennbar sein. Die Zellen wurden dann resuspendiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt

und deren Anzahl bestimmt. Um die Beads zu entfernen wurden sie mit einigen Millilitern PBS gewaschen, bei 1700 rpm über 6 Minuten zentrifugiert und wieder in 1 ml Cellgro-Medium pro 1 Million NK-Zellen aufgenommen. Diese konnten erneut in einer 24-Well-Platte mit 1 Million NK-Zellen pro Loch ausgesät werden. Bei Bedarf musste die Zellkultur nochmals gesplittet werden, um optimale Wachstumsbedingungen beizubehalten. Nach 13 bis 14 Tagen waren die NK-Zellen für Versuche einsatzbereit.

### **2.2.5 Kokultur von MCF-7-Zellen und NK-Zellen bzw. Inkubation mit NK-Zell-Überstand**

Zum Imitieren eines Killing-Angriffs durch NK-Zellen und der konsekutiven Immunoselektion von Tumorzellen wurde eine Kokultur aus Tumorzellen und NK-Zellen angelegt. Dazu wurden einige Millionen adhärenter MCF-7-Tumorzellen mit Accutase vom Flaschenboden abgelöst und in einzelnen Fraktionen ausgesät. Für die nachfolgende Durchflusszytometrie wurden üblicherweise 1 Million Tumorzellen pro Loch in eine 6-Well-Platte ausgesät, zur Gewinnung der RNA wurden mindestens 5 Millionen Tumorzellen in einer mittleren Zellkulturflasche verwendet. Nach 3-4 Stunden Inkubation bei 37°C wuchsen die Tumorzellen wieder adhärent, sodass NK-Zellen im Verhältnis 5:1 (Effector/Target-Ratio = 5/1) dazu pipettiert werden konnten. Diese Kokultur wurde über 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert bis die NK-Zellen einen Großteil der Tumorzellen lysiert hatten und nur noch wenige Zellen adhärent waren. Die toten, schwimmenden Zellen bzw. Zelltrümmer wurden mitsamt des Mediums und den darin enthaltenen NK-Zellen abgesaugt. Anschließend wurde das Gefäß drei Mal mit PBS gespült, um sowohl die restlichen NK-Zellen als auch Zelltrümmer weitestgehend zu entfernen. Die verbliebenen Tumorzellen wurden wiederum auf schonende Weise mit Accutase abgelöst und dann für durchflusszytometrische Untersuchungen oder zur RNA-Isolierung weiterverarbeitet.

Um den Einfluss von Zytokinen während einer Kokultur von Tumorzellen und NK-Zellen auszuschließen, inkubierten wir MCF7-Tumorzellen lediglich mit NK-Zell-Überstand. Dieser wurde gewonnen, indem die NK-Zellen mitsamt ihres Mediums entnommen und bei 1800 rpm über 5 Minuten zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und für den Versuch verwendet, während die NK-Zellen selbst anderweitig eingesetzt wurden. Es wurde gleichsam verfahren wie im oben beschriebenen Versuch,

jedoch, statt NK-Zellen, 1 ml NK-Zell-Überstand zur Inkubation der Tumorzellen verwendet. Veränderungen in der Tumorphopulation wurden durchflusszytometrisch ermittelt (siehe 2.2.2).

## **2.2.6 Nachweise über die Selektion von Tumorstammzellen**

### **2.2.6.1 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenexpression von NK-Zell-Liganden auf Brustkrebszellen**

Im Hinblick auf die quantitative Oberflächenexpression der NKG2D-Liganden *MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2* und *ULBP3*, der DNAM-1-Liganden *CD112* und *CD155* sowie der MHC1-Komplexe führten wir eine durchflusszytometrische Analyse durch. Dafür bezogen wir die Brustkrebszelllinien MCF-7, MCF-7 6x-selected, BT-474, SKBR-3 und MDA-MB-231 ein. Nach dem Ablösen der Zellen und Blockieren der unspezifischen Bindungsstellen, analog zum Verfahren in 2.2.2, wurden die Zellsuspensionen zu jeweils 500.000 Zellen pro FACS-Röhrchen aufgeteilt, mit FACS-Puffer gewaschen, bei 1800 rpm über 5 Minuten abzentrifugiert und in je 50 µl FACS-Puffer aufgenommen. Alle Aktionen wurden auf Eis bzw. bei 4°C durchgeführt. Es folgten drei Schritte zur spezifischen Färbung der Tumorzellen (**Tab. 1**): Zuerst wurden die Tumorzellen mit Antikörpern gegen die verschiedenen genannten NK-Zell-Liganden bzw. deren Isotypen auf dem Probenschüttler vermischt und 30 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen und Zentrifugieren der Proben, wurden die Fc-Teile der nun an den Tumorzellen hängenden primären Antikörper an einen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gekoppelt, der im PE-Kanal detektiert werden konnte. Auch dieser zweite Inkubationsschritt erfolgte über 30 Minuten mit zweifachem Waschen der Zellen, da der Farbstoff sehr intensiv ist und überschüssige Fluoreszenzsignale in der durchflusszytometrischen Analyse ein Störfaktor wären. Als drittes wurden alle Zellen mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD44-APC und CD24-FITC auf gleiche Weise wie in den vorigen Schritten gefärbt. Das ermöglichte uns die Unterscheidung von Tumorstammzellen ( $CD44^{high}/CD24^{low}$ ) und Nichtstammzellen ( $CD44^{high}/CD24^{high}$ ) bezüglich derer Oberflächenstrukturen. Nach dem letzten Waschgang wurden die markierten Zellen in jeweils 200 µl 7-AAD enthaltenden FACS-Puffer aufgenommen, was auch die Erkennung toter Zellen und Zelltrümmer sicherte. Um eine verlässliche Subpopulation der spärlicher enthaltenen  $CD24^{low}$ -Zellen abgrenzen zu können, wurden mindestens

100.000 Zellen pro Probe durchflusszytometrisch analysiert. Die Auswertung erfolgte anhand des Computerprogramms Summit.

**Tab. 1:** Färbeschema für die Oberflächenexpression von NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen

	<b>Schritt 1</b>	<b>Schritt 2</b>	<b>Schritt 3</b>		<b>Schritt 4</b>
<b>Isotypen</b>	-	Sek-PE	IgG1-APC	IgG1-FITC	7-AAD
	IgG1		CD44-APC	CD24-FITC	
	IgG2a				
	-	IgG1-PE			
<b>NKG2D-Liganden</b>	MICA	Sek-PE	CD44-APC	CD24-FITC	
	MICB				
	ULBP1				
	ULBP2				
	ULBP3				
<b>DNAM-1-Liganden</b>	-	CD112-PE	Sek-PE		
	CD155				
<b>MHC1</b>	MHC1				

### 2.2.6.2 Zellsortierung und Bestimmung der mRNA-Expression von

#### NK-Zell-Liganden in MCF-7-Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR

Auch auf RNA-Ebene untersuchten wir die NKG2D-Liganden *MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2* und *ULBP3*, die DNAM-1-Liganden *CD112* und *CD155* sowie MHC-Komplexe der Klasse 1. Um die Expression dieser NK-Zell-Liganden unter Tumorstammzellen und Nichtstammzellen unterscheiden zu können, führten wir eine Zellsortierung mittels Durchflusszytometrie (FACSVantage) durch. Dazu wurden native MCF-7-Zellen und 6-fach selektionierte MCF-7-Zellen, für die FACS-Analyse, wie unter 2.2.2 beschrieben, vorbereitet und mit den fluoreszenzgekoppelten Antikörpern CD24-FITC und CD44-PE markiert. Zur Vermeidung von Zellkonglomeraten wurde die Suspension vor der FACS-



Analyse durch ein 40  $\mu\text{M}$ -dichtes Sieb gefiltert. Durch ihre unterschiedlichen elektrischen Ladungen konnten CD24<sup>high</sup>- sowie CD24<sup>low</sup>-Zellen in verschiedenen Röhren aufgefangen werden und für die RNA-Isolation Verwendung finden. Im Folgenden konnten mittels quantitativer Real-Time-PCR (analog zu 2.2.3) und spezifischer Primer Genexpressionsmuster der genannten NK-Zell-Liganden zwischen Tumorstammzellen und Nichtstammzellen verglichen werden.

## **2.2.7 Nachweise über die Induktion von Tumorstammzellen**

### **2.2.7.1 Stammzellepletion und durchflusszytometrischer Nachweis de novo entstandener Tumorstammzellen**

Um die „de novo“-Synthese von Tumorstammzellen zu demonstrieren, legten wir eine Kokultur aus stammzellepletierten Tumorzellen und NK-Zellen an. Die Tumorstammzellen der MCF-7-Zellpopulation wurden durch magnetische Aufreinigung entfernt, sodass nur noch Nichtstammzellen übrig blieben. Dazu verwendeten wir das „Magnetic beads cell separation system“ von MACS-Miltenyi. So wurden Nichtstammzellen (CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>high</sup>) durch CD24-Antikörper-gekoppelte Beads markiert und über ein magnetisches Feld der Gesamtpopulation entzogen. Die übrigen CD24<sup>low</sup>-Tumorstammzellen wurden verworfen. Die CD24-positiven Nichtstammzellen konnten dann für eine Kokultur mit NK-Zellen bzw. als Kontrolle verwendet werden (siehe 2.2.5) Der Nachweis neu entstandener Tumorstammzellen erfolgte über eine CD24/CD44-Färbung in der Durchflusszytometrie (analog zu 2.2.2).

### **2.2.7.2 RNA-Expression epithelialer und mesenchymaler Marker in MCF-7-Zellen vor und nach Kokultur mit NK-Zellen mittels quantitativer Real-Time-PCR**

De novo entstandene Tumorstammzellen, die eine EMT durchlaufen haben, weisen Veränderungen in ihrem Genexpressionsmuster auf [16]. Vor diesem Hintergrund untersuchten wir die mRNA-Synthese des epithelialen Adhäsionsmoleküls *E-Cadherin*, sowie der mesenchymalen Marker *Vimentin* (einem Zytoskelettelement aus der Gruppe der Desmine) sowie die EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren *Snail*, *Twist*, und *Slug* und die stammzelltypischen Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *KLF4* und *cMyc*. Es wurde RNA von MCF-7-Brustkrebszellen vor und nach einem Killing-Angriff durch NK-Zellen

isoliert und mit den spezifischen Primern zur Genamplifikation für die quantitative Real-Time-PCR aufbereitet und analysiert (siehe 2.2.3).

### **2.2.7.3 Durchflusszytometrischer Nachweis einer Stammzellinduktion nach Kokultur von MCF-7-Zellen und Concanamycin-behandelten NK-Zellen**

Concanamycin A, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide, fungiert als spezifischer Inhibitor der membrangebundenen H<sup>+</sup>-ATPase von NK-Zellen. Es verhindert so deren Degranulation und die konsekutive Lyse von Tumorzellen. Diese ineffiziente Immunreaktion demonstrierten wir in einer Kokultur aus MCF-7-Brustkrebszellen und NK-Zellen (Effector/Target-Ratio 2:1), die mit 2 µM Concanamycin über 120 Minuten präinkubiert wurden. Nach 16-stündiger Kokultur im Brutschrank wurde eine FACS-Färbung mit CD24-FITC- und CD44-PE-Antikörpern durchgeführt (siehe 2.2.2). Der Stammzellanteil konnte in der darauffolgenden Fluoreszenz-Analyse ersehen werden.

Um den Einfluss von Zytokinen auf die Induktion von Tumorstammzellen abzuschätzen, führten wir den gleichen Versuch im Transwell durch, wo Tumorzellen, im selben Gefäß, jedoch abgetrennt durch eine Membran, nicht in direkten Kontakt mit NK-Zellen treten konnten.

### **2.2.7.4 Durchflusszytometrische Analyse nach der Kokultur von MCF-7-Zellen und NK-Zellen unter Blockade von NK-Zell-Rezeptoren bzw. MHC1-Molekülen**

Um die Bedeutung von NK-Zell-Rezeptoren für die Induktion von Tumorstammzellen zu untersuchen, setzten wir Blocking-Antikörper gegen NKG2D- und DNAM-1-Liganden ein. So wurden die NK-Zellen in nativer Form oder nach der Vorbehandlung mit Concanamycin A (siehe 2.2.7.2) mit blockierenden Antikörpern gegen NKG2D- und DNAM-1-Rezeptoren inkubiert. Dazu wurde 1 Million NK-Zellen in 100 µl Medium aufgenommen und beide Antikörper nach kräftigem Mischen auf dem Probenschüttler jeweils in einer Konzentration von 1:100 dazugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über 30 Minuten bei 4°C. Hiernach wurden die Zellen nicht gewaschen, sodass der Antikörper weiterhin im Überschuss vorhanden war. Auf die gleiche Art und Weise inkubierten wir MCF-7-Zellen mit blockierenden Antikörpern gegen MHC1-Moleküle. Anschließend

wurde eine Kokultur aus nativen Tumor- und vorbehandelten NK-Zellen bzw. aus vorbehandelten Tumorzellen und nativen NK-Zellen (analog zu 2.2.5) angelegt und der resultierende Stammzellanteil durchflusszytometrisch ermittelt (siehe 2.2.2).

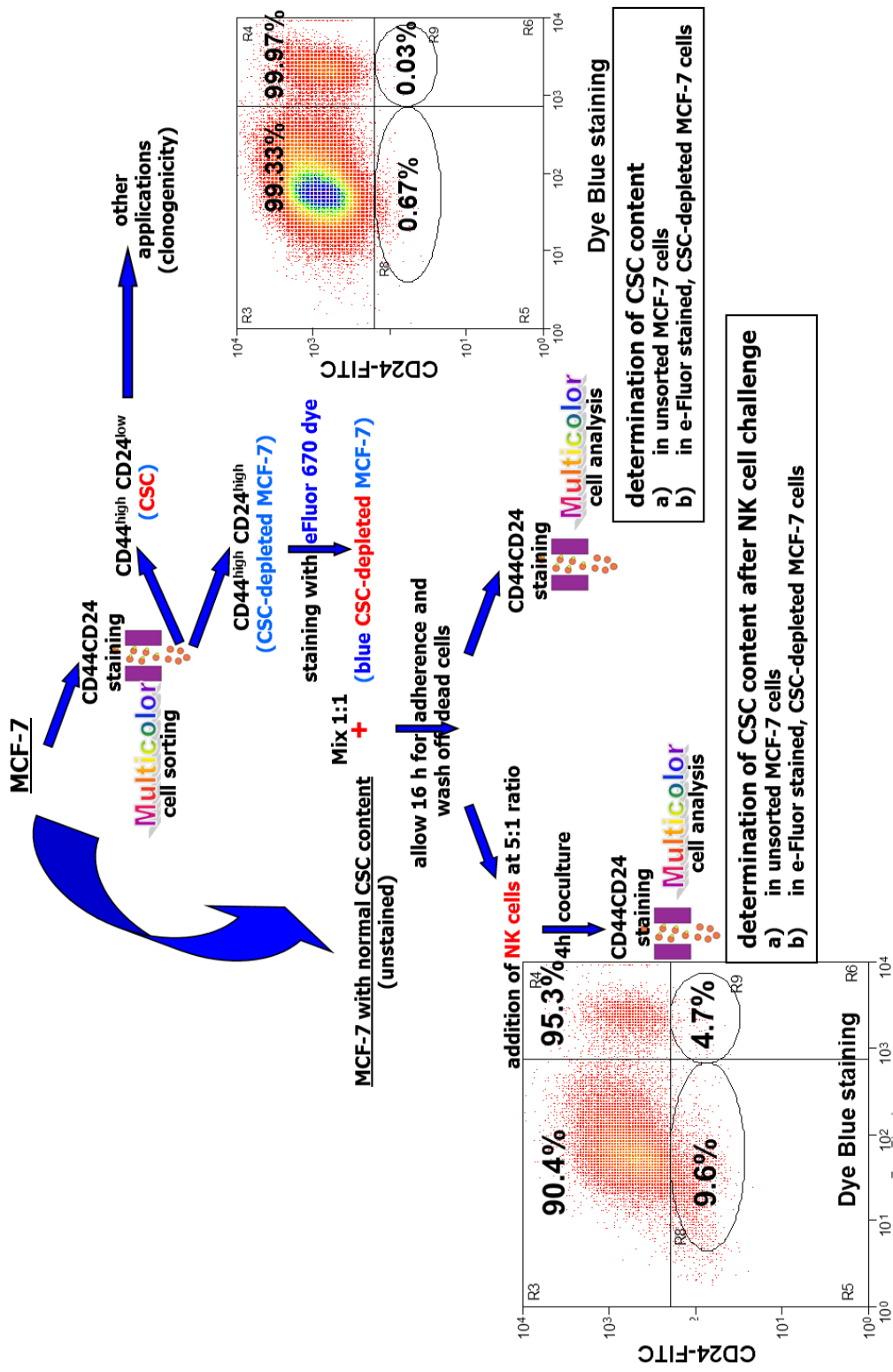
### **2.2.8 Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil selektionierter und induzierter Tumorstammzellen im Vergleich**

Um das anteilige Verhältnis zwischen selektionierten und induzierten Stammzellen darzustellen, kombinierten wir native MCF-7-Tumorzellen mit einer Population aus stammzelldepletierten (also ausschließlich CD24<sup>high</sup>) MCF-7-Zellen und legten aus dieser neuen, 1:1-gemischten Tumorzellpopulation eine Kokultur mit NK-Zellen an.

Die Population aus CD24<sup>high</sup>-Tumorzellen wurde vor dem Vermischen mit der herkömmlichen, heterogenen Tumorzellpopulation mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Cell Proliferation Dye eFluor 670* markiert (Verfahren wie in 2.2.2 für NK-Zellen). So konnten diese Zellen in der Durchflusszytometrie gut voneinander abgegrenzt werden.

Nach der Aussaat und Kokultur mit NK-Zellen wurden die Tumorzellen, ähnlich wie in 2.2.2 beschrieben, für die Durchflusszytometrie vorbereitet. Da im APC-Kanal das Fluoreszenzsignal von *Dye eFluor 670* zur Abgrenzung der stammzelldepletierten Tumorzellen detektiert wurde, musste auf eine spezielle Färbung von NK-Zellen verzichtet werden. Sie konnten jedoch anhand ihrer Morphologie (im FSC/SSC) oder als avitale Zellen (7-AAD-positiv) von den MCF-7-Zellen abgegrenzt werden.

Mit Hilfe verschiedener Gatings konnten prozentuale Angaben über die Menge selektionierter und induzierter Tumorstammzellen getroffen werden.



**Abb. 5: Durchflusszytometrische Ermittlung des Anteils selektierter und induzierter Tumorstammzellen**

Native MCF-7-Zellen wurden mit gefärbten, stammzelldepletierten (CD24<sup>high-</sup>) MCF-7-Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt und dann mit NK-Zellen für 16h ko-inkubiert. Daraufhin wurde der jeweilige TSZ-Anteil mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.

### **2.2.9 Klonogenität von MCF-7-Zellen nach einer Kokultur mit NK-Zellen**

Die Fähigkeit Tochterzellen und damit neue Kolonien (in diesem Fall Mammosphären) zu bilden ist ein wichtiges Merkmal von Tumorstammzellen [13]. Diese Klonogenität überprüften wir für native MCF-7-Brustkrebszellen, sowie für immunoselektionierte MCF-7-Zellen und solche die nach einer Kokultur mit Concanamycin-vorbehandelten NK-Zellen induziert worden sind. Dazu wurden die jeweiligen Zellen mit Accutase abgelöst und zu 50 pro Well auf einer 24-Well-Platte ausgesät. Nach 2 bis 3 Wochen konnten unter dem Mikroskop genügend neugebildete Zellklone erkannt werden. Zum Auszählen der Kolonien wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit einer 0,5%-igen Kristallviolettlösung gefärbt. Nach 20-minütiger Inkubation auf der Schüttelwaage wurde die Lösung abgeschüttet und die gefärbten Zellen 3 bis 5 Mal mit fließendem Wasser gewaschen. Die Kolonien wurden als sichtbare blaue Punkte mit dem bloßen Auge gezählt.

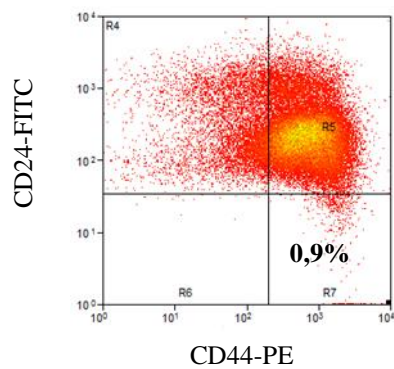
### **2.2.10 Statistik**

Alle Versuche wurden mindestens drei Mal mit gleichartigen Ergebnissen durchgeführt. Die Auswertung, also sämtliche Berechnungen, erfolgten mit Hilfe der Computersoftware „Excel“ von Microsoft (Redmond, Washington, USA). Die Signifikanzanalyse der Daten erfolgte mittels Student's nicht gepaartem t-Test und ANOVA (Analysis of Variance).

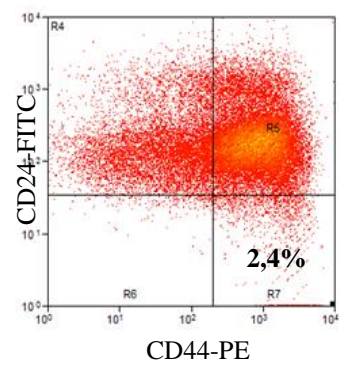
### **3 Ergebnisse**

#### **3.1 Nachweis einer Tumorstammzellenanreicherung nach der Kokultur von MCF-7-Brustkrebszellen mit NK-Zellen**

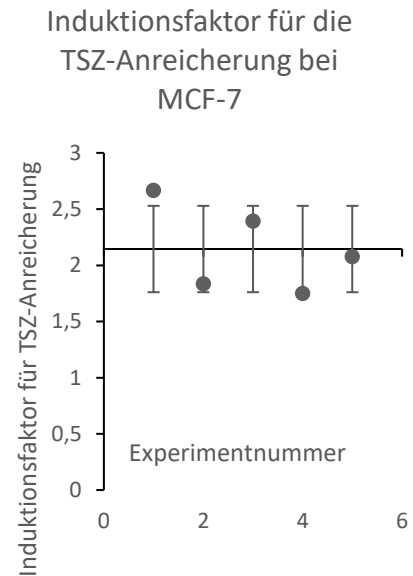
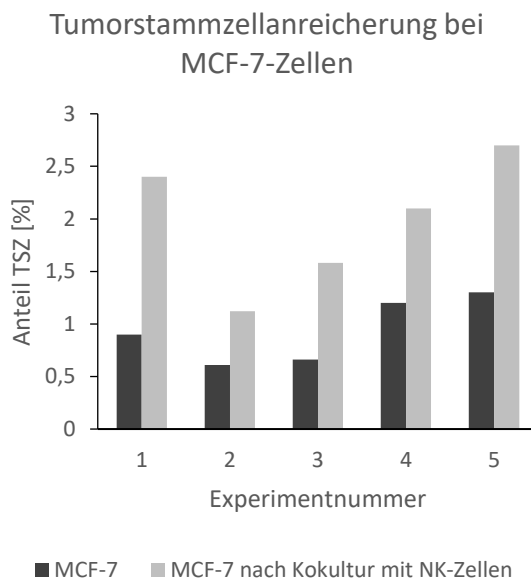
Nach einem Killing-Angriff durch NK-Zellen konnten wir eine Anreicherung von CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-MCF-7-Zellen ohne den Einsatz des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab feststellen. Während in der durchflusszytometrischen Analyse eine Rate von 0,9% Tumorstammzellen in der MCF-7-Ausgangspopulation festgestellt wurde, lag der Stammzellanteil von MCF-7-Zellen nach einer Kokultur mit NK-Zellen im Vergleich dazu bei 2,4% (Abb. 6). Innerhalb dieser Versuchsreihe wurde, nach dem Kontakt zu NK-Zellen, eine durchschnittliche Stammzellenanreicherung um den Faktor 2 erreicht.



**MCF-7 Kontrolle**



**MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen**

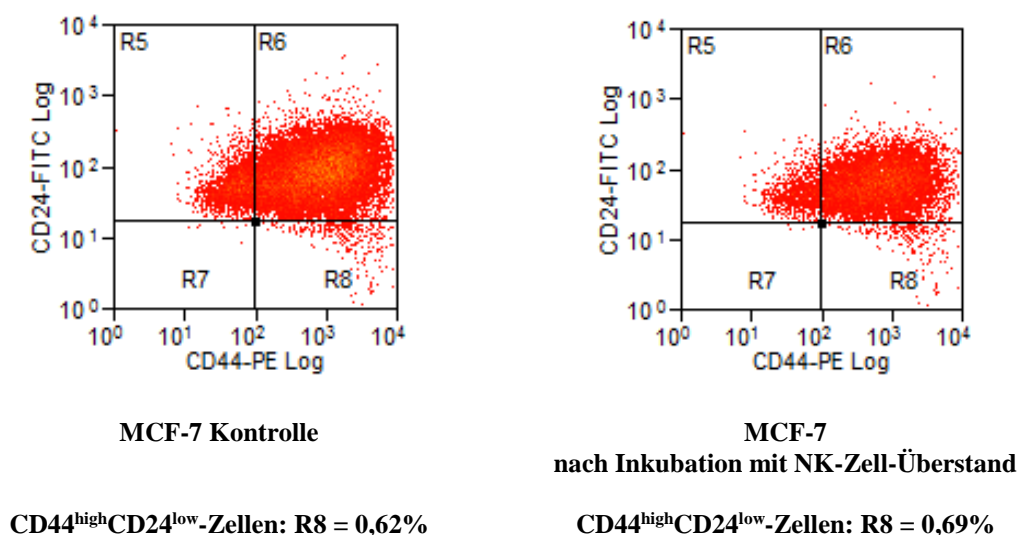


**Abb. 6: Tumorstammzell-Population von MCF-7-Zellen vor und nach Kokultur mit NK-Zellen**  
MCF-7-Zellen wurden entweder unbehandelt kultiviert (**links oben**) oder für 16 h mit NK-Zellen ko-inkubiert (**rechts oben**). Anschließend wurde der Anteil der CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> TSZ innerhalb der MCF-7-Population mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt. Eine Übersicht zur TSZ-Anreicherung innerhalb dieser Versuchsreihe ist **links unten** zu sehen. Native MCF-7-Zellen sind **schwarz** dargestellt, MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen **grau**. **Rechts unten** sind die jeweiligen Induktionsfaktoren für die TSZ-Anreicherung nach Kokultur von MCF-7-Zellen mit NK-Zellen mit ihrer Standardabweichung um den Mittelwert aufgetragen.

**P-Wert:** 0,01692881

### 3.2 Inkubation von MCF-7-Brustkrebszellen mit NK-Zell-Überstand erbringt keine Tumorstammzellenanreicherung

NK-Zellen sezernieren einige Zytokine, die hauptsächlich zur Tötung von Zielzellen, aber auch zur Interaktion mit anderen Immunzellen, dienen. Dazu zählen u.a. Perforine, Granzyme, TNF- $\alpha$  und Interferone, die normalerweise erst nach Kontakt zu fremden Zellen ausgeschüttet werden, jedoch auch im Medium aktivierter NK-Zellen vorhanden sein können [28]. Um einen möglichen Einfluss dieses NK-Zell-Milieus auf die Entstehung von Tumorstammzellen zu untersuchen, inkubierten wir MCF-7-Zellen lediglich mit Überstand aus einer aktivierten NK-Zell-Kultur. Es ergab sich ein Anteil an CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen von 0,69%, was der Größenordnung einer nativen MCF-7-Zellpopulation entspricht (0,62%) (Abb. 7). Allein der Kontakt mit NK-Zell-Medium führt also zu keiner relevanten Veränderung der Tumorstammzell-Population.



**Abb. 7: Tumorstammzell-Population von MCF-7-Zellen vor und nach Inkubation mit NK-Zell-Überstand**

MCF-7-Zellen wurden entweder unbehandelt kultiviert (**links**), oder für 16h mit NK-Zell-Überstand inkubiert (**rechts**). Anschließend wurde der Anteil der CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> TSZ innerhalb der MCF-7-Population mittels durchflusszytometrischer Analyse bestimmt.



**Tab. 2: Tumorstammzellanteil von MCF-7-Zellen nach Inkubation mit NK-Zell-Überstand im Vergleich zur Kontrolle (n=3), p-Wert**

<b>TSZ-Anteil [%]</b>				<b>Mittelwert</b>	<b>p-Wert</b>
MCF-7 Kontrolle	0,62	0,63	0,71	0,6533333333	0,24
MCF-7 nach Inkubation mit NK-Zell-Überstand	0,69	0,69	0,7	0,6933333333	

### 3.3 Hinweise für die Selektion von Tumorstammzellen

#### 3.3.1 CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen haben eine veränderte Oberflächenexpression von NK-Zell-Liganden im Vergleich zu CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>-Zellen

Um einen Selektionsvorteil von Tumorstammzellen gegenüber Nichtstammzellen aufzudecken, fassten wir die für die NK-Zell-abhängige Lyse von Tumorzellen relevanten NK-Zell-aktivierenden NKG2D-Liganden (*MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*), DNAM-1-Liganden (*CD112* und *CD155*) und inhibierende MHC1-Moleküle ins Auge. Dabei zeigten sich in der durchflusszytometrischen Analyse (siehe 2.2.6.1) für alle untersuchten Brustkrebszelllinien (MCF-7, SKBR-3, BT-474 und MDA-MB-231) signifikante Unterschiede zwischen CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>- und CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen hinsichtlich deren Oberflächenexpression (Surface Expression, SFI) (Abb. 8 bis Abb. 12). CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen der Linie MCF-7 ließen eine deutlich verminderte oberflächliche Expression insbesondere von *MICA* und *ULBP2*, sowie der DNAM-1-Liganden (*CD112* und *CD155*) und eine geringfügige Minderung von *MICB* erkennen, während *ULBP1* und *ULBP3* so gut wie gar keine Expression zeigten (Abb. 8). Diese Beobachtung ließ sich auf 6-fach selektionierte MCF-7-Zellen (MCF-7-Zellen, die sechs Angriffe durch NK-Zellen und Trastuzumab überlebt hatten) mit einem ähnlich prägnanten Ergebnis übertragen. Zudem zeigten sie gruppenübergreifend eine geringere Ligandenexpression als native MCF-7-Zellen (Abb. 9). SK-BR-3-Stammzellen zeigten Expressionsminderungen von *ULBP2*, *ULBP3* und der DNAM-1-Liganden (*CD112* und *CD155*). BT-474 zeichnete sich durch eine alle Liganden übergreifende verminderte Oberflächenexpression aus mit einer moderaten Minderung innerhalb der Tumorstammzellpopulation. Zellen, der Linie MDA-MB-231 zeigten eine verminderte Expression aller NKG2D-Liganden auf Tumorstammzellen. Sie stellten jedoch die einzige Ausnahme dar, deren *CD112*-Dichte auf Tumorstammzellen beinahe doppelt so hoch war wie auf Nichtstammzellen und deren *CD155*-Liganden zwar relativ gut vertreten waren, aber keine unterschiedliche Präsenz auf CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>- und CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen mit sich brachten (Abb. 12).

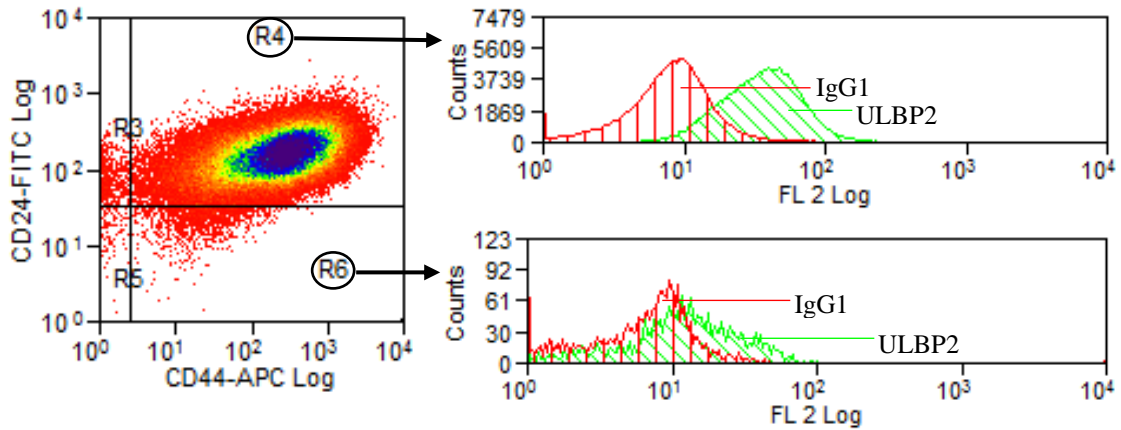
Die MHC1-Expression aller untersuchten Brustkrebszelllinien lag für Nichtstammzellen bei vergleichbar hohen Werten und war innerhalb der jeweiligen Tumorstammzellpopulationen deutlich vermindert.

In der Gesamtschau zeigte sich für jede untersuchte Brustkrebszelllinie ein individuelles

Expressionsmuster der oberflächlichen NK-Zell-Liganden mit speziell herunterregulierten NK-Zell-Liganden innerhalb der Tumorstammzell-Subpopulationen.

**Tab. 3: Signifikanzberechnungen von Unterschieden zwischen der Expression von NK-Zell-Liganden auf TSZ und NSZ bei MCF-7-Zellen (n=3)**

MCF-7	MicA	MicB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	CD112	CD155	MHC1
<b>p-Wert</b>	0,01	0,3	0,92	0,0005	0,65	0,06	0,03	0,14



### MCF-7-Zellen (Dot-Plot im FITC- und APC-Kanal)

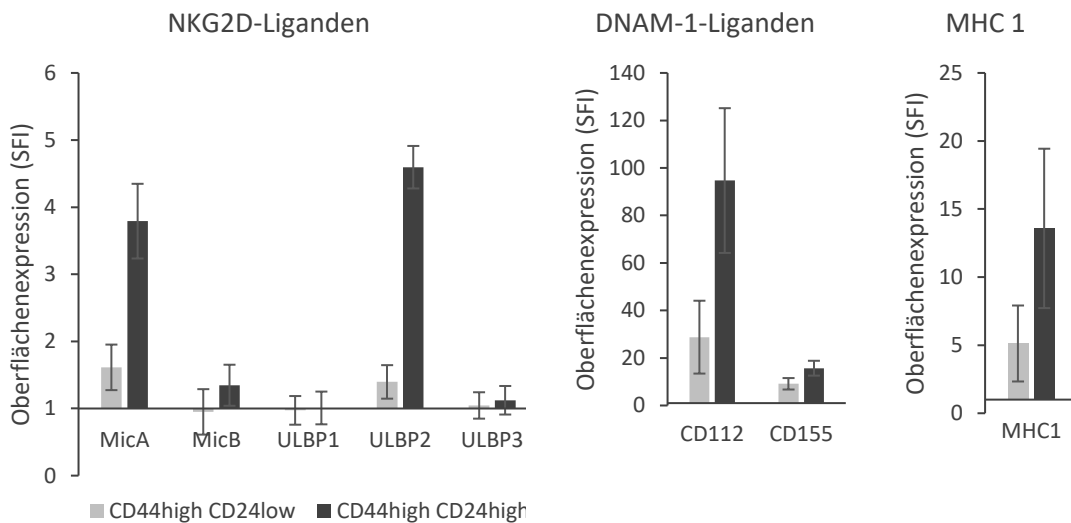
In der Durchflusszytometrischen Analyse wurden Gates für TSZ und NSZ gesetzt.

**R4:** CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup> → 98,7% NSZ  
**R6:** CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> → 0,66% TSZ

### Expression von ULBP2 auf MCF-7-Zellen (im PE-Kanal)

Mittels weiterer durchflusszytometrischer Analysen wurden TSZ und NSZ getrennt voneinander auf ihre oberflächliche Expression von NK-Zell-Liganden untersucht.

**Oben:** ULBP2 (**grün**) und Isotyp (**rot**) auf NSZ  
**Unten:** ULBP2 (**grün**) und Isotyp (**rot**) auf TSZ



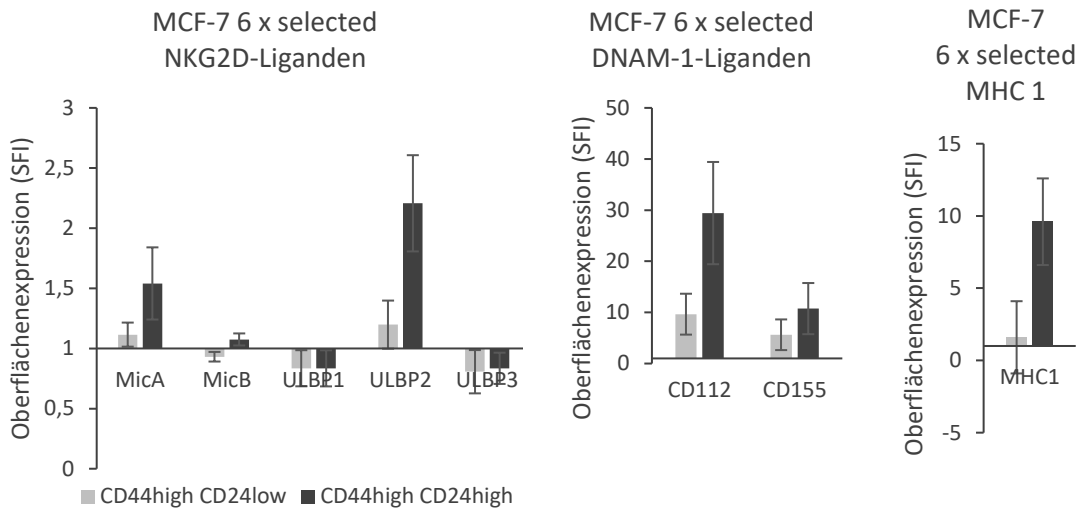
### Abb. 8: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf MCF-7-Zellen

Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Oberflächenexpression (SFI) verschiedener NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen bestimmt. Mittels unterschiedlich fluoreszierender Antikörper konnten Gates für Tumorstammzellen und Nicht-Stammzellen gesetzt werden und die Expression von NK-Zell-Liganden getrennt quantifiziert werden.

CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup>: Tumorstammzellen (TSZ) (**grau**)

CD44<sup>high</sup> CD24<sup>high</sup>: Nichtstammzellen (NSZ) (**schwarz**)

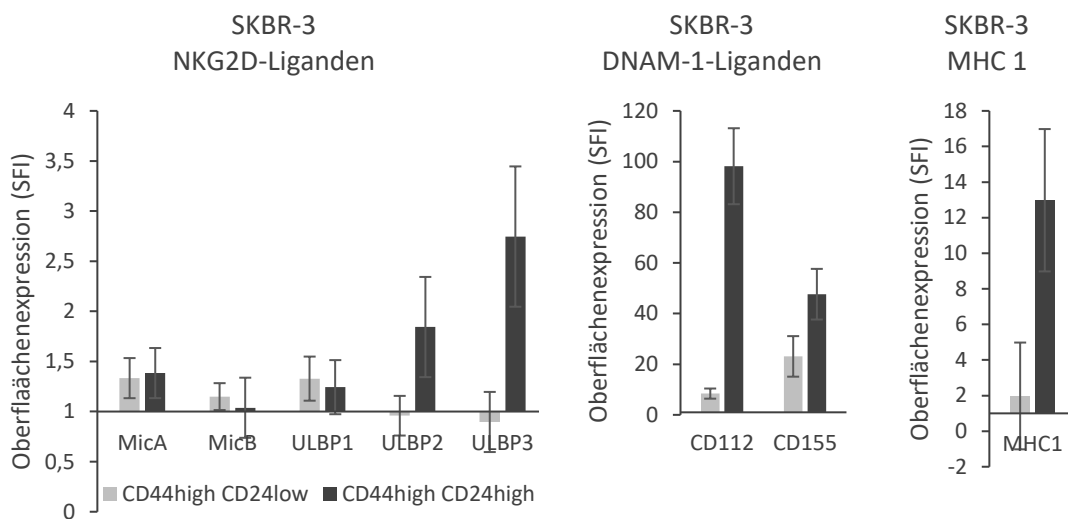
SFI = Surface Expression (Oberflächenexpression)



**Abb. 9: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf MCF-7-Zellen 6x selected**  
 Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Oberflächenexpression (SFI) verschiedener NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen bestimmt. Mittels unterschiedlich fluoreszierender Antikörper konnten Gates für Tumorstammzellen und Nicht-Stammzellen gesetzt werden und die Expression von NK-Zell-Liganden getrennt quantifiziert werden.  
 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup>: Tumorstammzellen (TSZ) (**grau**)  
 CD44<sup>high</sup> CD24<sup>high</sup>: Nichtstammzellen (NSZ) (**schwarz**)  
 SFI = Surface Expression (Oberflächenexpression)

**Tab. 4: Signifikanzberechnungen von Unterschieden zwischen der Expression von NK-Zell-Liganden auf TSZ und NSZ bei MCF-7-Zellen 6x selected (n=3)**

MCF-7 6x selected	MicA	MicB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	CD112	CD155	MHC1
p-Wert	0,13	0,01	0,99	0,03	0,7	0,08	0,24	0,051



**Abb. 10: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf SKBR-3-Zellen**

Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Oberflächenexpression (SFI) verschiedener NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen bestimmt. Mittels unterschiedlich fluoreszierender Antikörper konnten Gates für Tumorstammzellen und Nicht-Stammzellen gesetzt werden und die Expression von NK-Zell-Liganden getrennt quantifiziert werden.

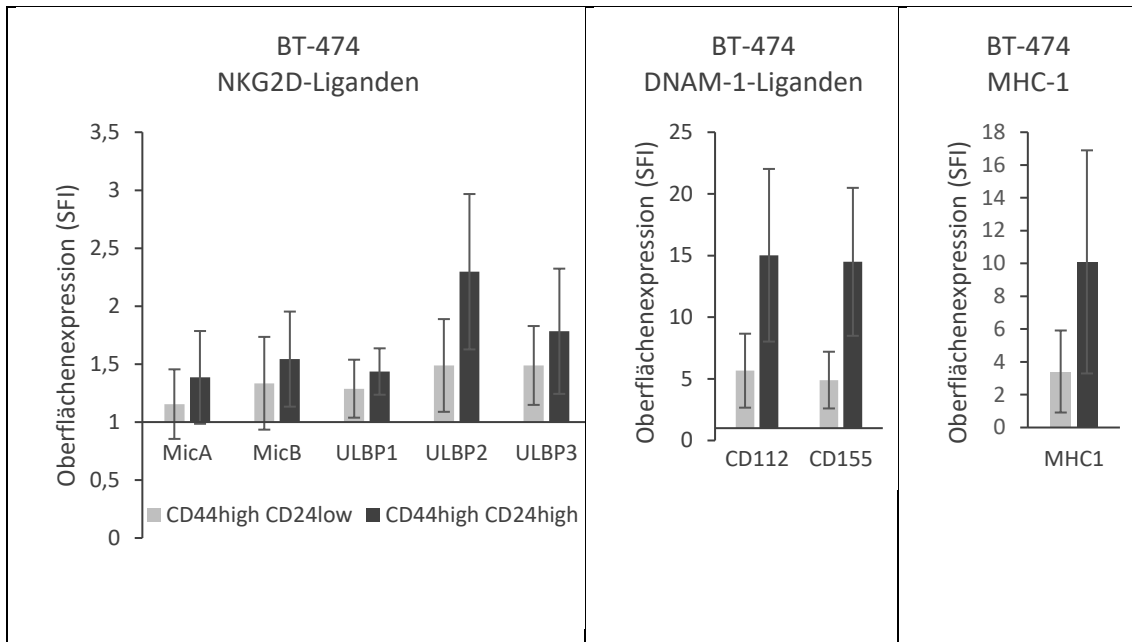
CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup>: Tumorstammzellen (TSZ) (**grau**)

CD44<sup>high</sup> CD24<sup>high</sup>: Nichtstammzellen (NSZ) (**schwarz**)

SFI = Surface Expression (Oberflächenexpression)

**Tab. 5: Signifikanzberechnungen von Unterschieden zwischen der Expression von NK-Zell-Liganden auf TSZ und NSZ bei SKBR-3-Zellen (n=3)**

SKBR-3	MicA	MicB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	CD112	CD155	MHC1
<b>p-Wert</b>	0,73	0,9	0,85	0,1	0,04	0,01	0,05	0,04



**Abb. 11: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf BT-474-Zellen**

Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Oberflächenexpression (SFI) verschiedener NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen bestimmt. Mittels unterschiedlich fluoreszierender Antikörper konnten Gates für Tumorstammzellen und Nicht-Stammzellen gesetzt werden und die Expression von NK-Zell-Liganden getrennt quantifiziert werden.

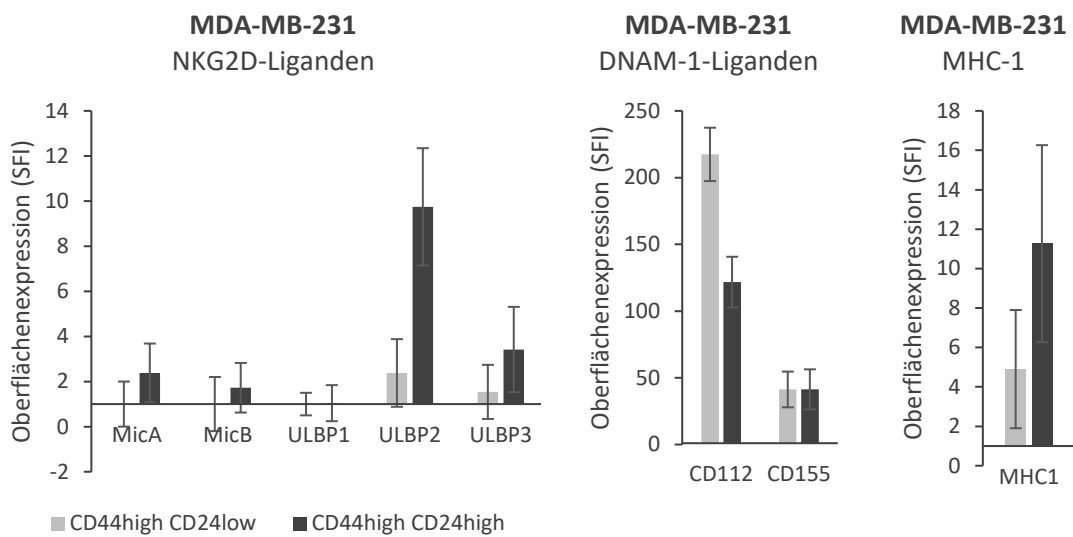
CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup>: Tumorstammzellen (TSZ) (**grau**)

CD44<sup>high</sup> CD24<sup>high</sup>: Nichtstammzellen (NSZ) (**schwarz**)

SFI = Surface Expression (Oberflächenexpression)

**Tab. 6: Signifikanzberechnungen von Unterschieden zwischen der Expression von NK-Zell-Liganden auf TSZ und NSZ bei BT-474-Zellen (n=3)**

BT-474	MicA	MicB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	CD112	CD155	MHC1
<b>p-Wert</b>	0,39	0,38	0,5	0,6	0,72	0,18	0,09	0,19



**Abb. 12: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf MDA-MB-231-Zellen**

Anhand von durchflusszytometrischen Analysen wurde die Oberflächenexpression (SFI) verschiedener NK-Zell-Liganden auf Tumorzellen bestimmt. Mittels unterschiedlich fluoreszierender Antikörper konnten Gates für Tumorstammzellen und Nicht-Stammzellen gesetzt werden und die Expression von NK-Zell-Liganden getrennt quantifiziert werden.

CD44<sup>high</sup> CD24<sup>low</sup>: Tumorstammzellen (TSZ) (**grau**)

CD44<sup>high</sup> CD24<sup>high</sup>: Nichtstammzellen (NSZ) (**schwarz**)

SFI = Surface Expression (Oberflächenexpression)

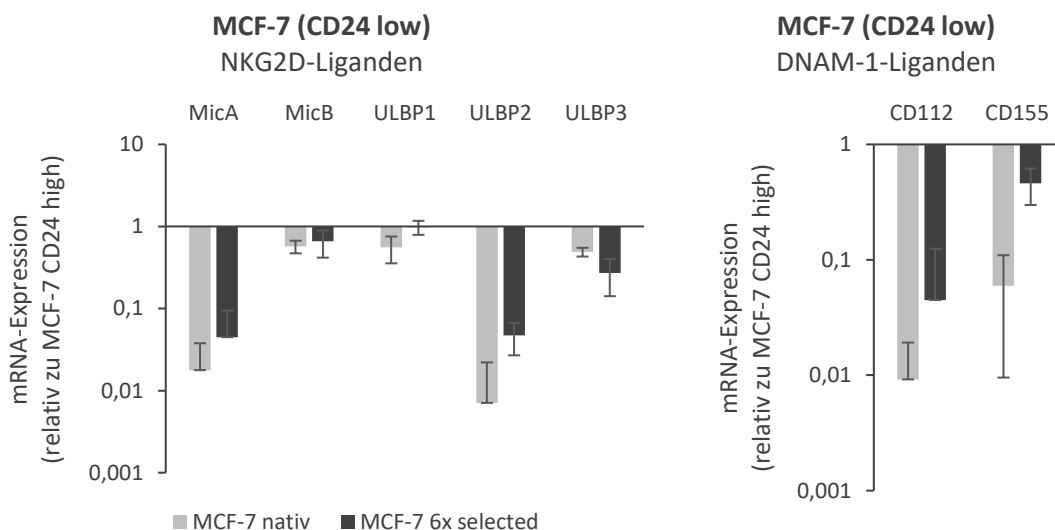
**Tab. 7: Signifikanzberechnungen von Unterschieden zwischen der Expression von NK-Zell-Liganden auf TSZ und NSZ bei MDA-MB-231-Zellen (n=3)**

MDA-MB-231	MicA	MicB	ULBP1	ULBP2	ULBP3	CD112	CD155	MHC1
<b>p-Wert</b>	0,3	0,53	0,83	0,34	0,28	0,008	0,989	0,19



### 3.3.2 CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen haben eine verminderte RNA-Expression von NK-Zell-Liganden im Vergleich zu CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>-Zellen

Für MCF-7-Brustkrebszellen stellten wir die veränderte Expression von NK-Zell-Liganden in sortierten CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>- und CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>-Zellen auf mRNA-Ebene dar. Die quantitative Real-Time-PCR erbrachte ein mit der Ausprägung der zuvor durchflusszytometrisch untersuchten oberflächlichen Strukturen gut zu vereinbarendes Resultat. CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen zeigten eine verminderte mRNA-Synthese von NK-Zell-Liganden im Vergleich zu den CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>-Zellen (Abb. 13). Bei MCF-7-Zellen, die sechs Immunantworten unterlaufen hatten, fiel der Unterschied zwischen CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>- und CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>-Zellen weniger extrem aus. Auch deren Ausgangspopulation wies schon eine niedrigere mRNA-Synthese-Rate für NK-Zell-Liganden auf.



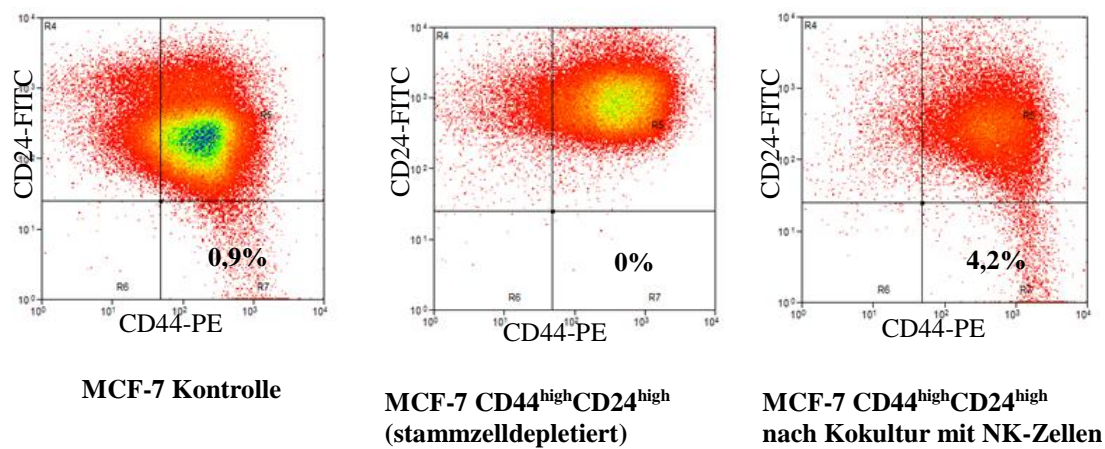
**Abb. 13: mRNA-Expression von NK-Zell-Liganden in MCF-7-Zellen (n=3)**

Die mRNA-Expression für NK-Zell-Liganden in Tumorzellen wurde aus nativen MCF-7-Zellen (**grau**) sowie aus 6-fach selektionierten MCF-7-Zellen (**schwarz**) quantifiziert. Die Expression der NKG2D-Liganden in CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen relativ zu der in CD44<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>-Zellen ist **links** zusehen, die relative Expression der DNAM-1-Liganden **rechts** dargestellt.

### 3.4 Hinweise für die Induktion von Tumorstammzellen

#### 3.4.1 Tumorstammzellen können „de novo“ aus Nichtstammzellen entstehen

Stammzelldepletierte MCF-7-Brustkrebszellen (0% TSZ) brachten nach der Inkubation mit NK-Zellen eine neu generierte  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Subpopulation hervor. Diese, ausschließlich aus differenzierten  $CD44^{high}CD24^{high}$ -Zellen neu entstandenen Tumorstammzellen erreichten mit 4,2% einen relativ hohen Anteil der Tumorzellpopulation (Abb. 14). So konnte ein Beweis für die Induktion von Tumorstammzellen geliefert werden.



**Abb. 14:** Stammzelldepletion und „de novo“-Synthese von Tumorstammzellen  
Durchflusszytometrische Quantifizierung der TSZ-Subpopulation in der MCF-7-Ausgangspopulation (links), nach Stammzelldepletion bei MCF-7-Zellen (Mitte) und nach Stammzelldepletion sowie Ko-Inkubation von MCF-7-Zellen mit NK-Zellen (rechts).

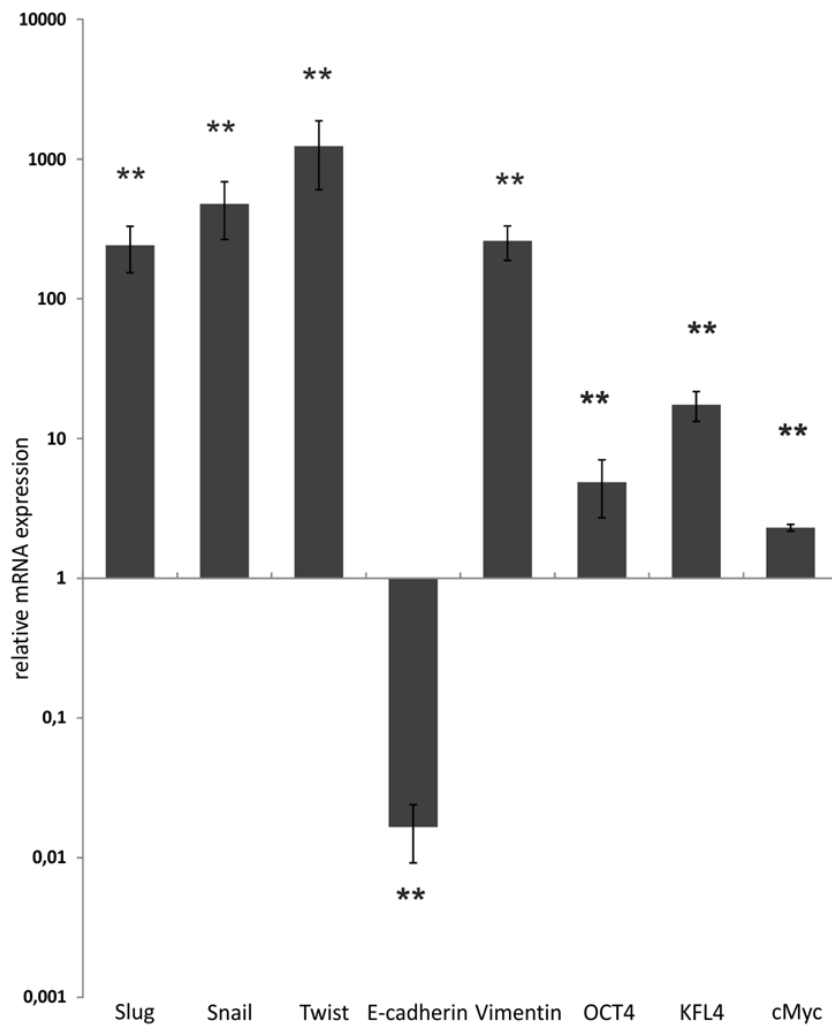
**Tab. 8:** Tumorstammzellanteil von MCF-7-Zellen nach Stammzelldepletion und Kokultur mit NK-Zellen im Vergleich zur Kontrolle (n=10)

TSZ-Anteil [%]										
MCF-7 Kontrolle	0,9	1,1	0,63	0,45	0,89	0,23	0,77	1,05	0,33	0,8
MCF-7 $CD44^{high}CD24^{high}$ nach Kokultur mit NK-Zellen	4,2	4,6	2,37	1,2	3,72	1,8	4,15	1,7	2,6	1,66

**P-Wert:** 0,00045334

### **3.4.2 EMT: Herunterregulation epithelialer Marker und Hochregulation mesenchymaler Marker von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen**

Die Hypothese, dass induzierte Tumorstammzellen durch “Epitheliale mesenchymale Transition” (EMT) entstehen [16], konnten wir anhand einer Analyse der mRNA-Expression typischer Oberflächenstrukturen und EMT-relevanter Transkriptionsfaktoren unterstützen. Immunresistente MCF-7-Zellen, die nach einem Angriff durch NK-Zellen übrig geblieben waren, zeigten eine verminderte Syntheseleistung von *E-Cadherin*, einem oberflächlichen Adhäsionsmolekül epithelial ausdifferenzierter Zellen. Mesenchymale Marker wie *Vimentin* (ein Element des Zytoskeletts aus der Gruppe der Desmine), die EMT-auslösenden Transkriptionsfaktoren *Slug*, *Snail* und *Twist*, sowie die stammzelltypischen, für Embryonalentwicklung und Zelldifferenzierung erforderlichen Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *KLF4* und *cMyc* wurden hochreguliert (Abb. 15).

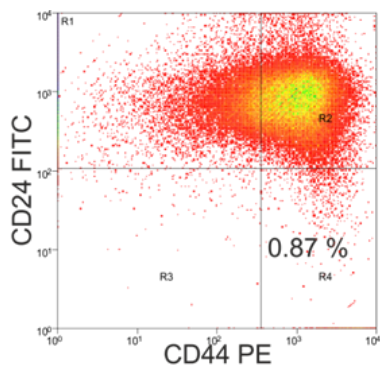


**Abb. 15: mRNA-Expression von EMT-Markern in MCF-7-Zellen**

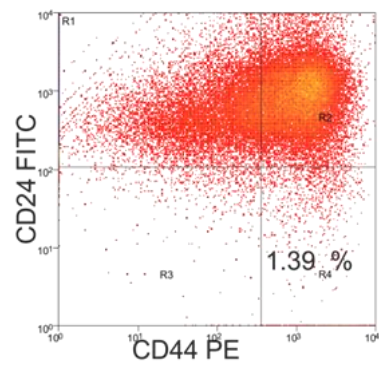
Dargestellt ist die mRNA-Expression verschiedener EMT-Marker in MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen relativ zur nativen MCF-7-Kontrollpopulation.

### **3.4.3 Ein ineffizienter Kontakt zwischen Tumorzellen und NK-Zellen mittels Concanamycin A führt zu einer erhöhten Stammzellenanreicherung**

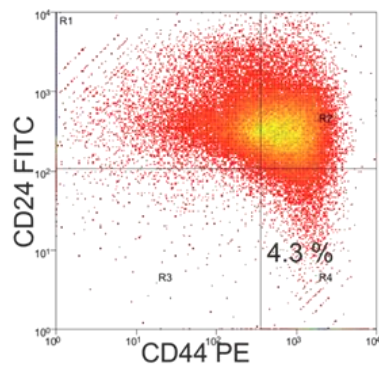
Ursprünglich sollte allein der Anteil induzierter Tumorstammzellen durch die Ausschaltung von Selektionsprozessen dargestellt werden. Concanamycin A, ein Antibiotikum aus der Gruppe der Makrolide, fungiert als spezifischer Inhibitor der membrangebundenen  $H^+$ -ATPase in NK-Zellen. So verhindert es die Degranulation von NK-Zellen und verringert damit ihre Fähigkeit Tumorzellen zu lysieren entscheidend. Diese ineffiziente Immunantwort macht den bestehenden Selektionsvorteil von Tumorstammzellen mit verminderter Expression aktivierender NK-Zell-Liganden unwirksam, sodass eine Anreicherung von Tumorstammzellen nach dem Kontakt zu präinkubierten NK-Zellen von geringerem Ausmaß sein müsste. Wir beobachteten allerdings den gegenteiligen Effekt. Der verlängerte Zell-Zell-Kontakt zwischen MCF-7-Brustkrebszellen und ineffizienten NK-Zellen führte zu einer enormen Steigerung des Tumorstammzellanteils (von 0,87% TSZ in der MCF-7-Ausgangspopulation auf 4,3% TSZ nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen, Vergleich: 1,39% TSZ nach Kokultur mit unbehandelten NK-Zellen) (Abb. 16), welche nicht durch den Mechanismus der Selektion erklärt werden kann. Diese Tumorstammzellen mussten neu entstanden sein. Wir übertrugen den Versuch in ein Transwell, in dem die direkte Zell-Zell-Interaktion unterbunden, ein Austausch von Zytokinen und anderen Mediatoren jedoch möglich war. Da in diesem Fall nur eine sehr geringe und eher zu vernachlässigende Tumorstammzell-Anreicherung eintrat (von 0,87% TSZ in der MCF-7-Ausgangspopulation auf 1,07% TSZ nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen im Transwell) (Abb. 16), können wir davon ausgehen, dass der direkte Kontakt von Tumorzellen mit NK-Zellen essentiell für die Induktion von Tumorstammzellen ist.



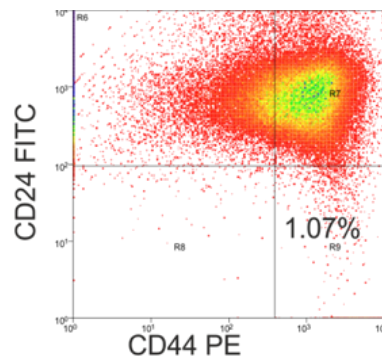
**MCF-7  
Kontrolle**



**MCF-7  
nach Kokultur mit NK-Zellen**



**MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen  
(präinkubiert mit Concanamycin A)**



**MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen  
(präinkubiert mit Concanamycin A)  
im Transwell**

**Abb. 16: Induktion von MCF-7-Tumorstammzellen nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen**

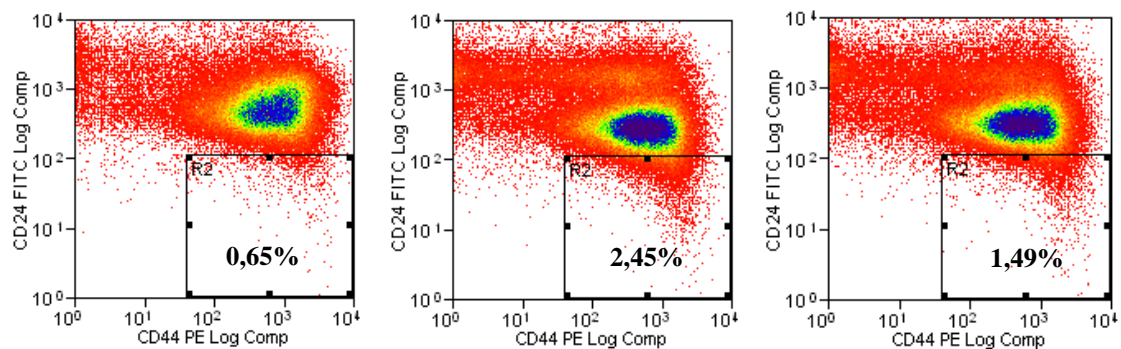
Durchflusszytometrische Bestimmung des TSZ-Anteils bei MCF-7-Zellen unter verschiedenen Bedingungen. **Oben links:** Native MCF-7-Zellen. **Oben rechts:** MCF-7-Zellen nach Kokultur mit unbehandelten NK-Zellen. **Unten links:** MCF-7-Zellen nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen. **Unten rechts:** MCF-7-Zellen nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen im Transwell.

**Tab. 9: Tumorstammzellanteil [%] von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen, die mit Concanamycin A präinkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrolle bzw. im Transwell (n=6)**

TSZ-Anteil [%]						
MCF-7-Kontrolle	0,87	0,91	0,56	0,71	0,39	0,8
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen	1,39	2,5	1,1	1,45	1,2	1,33
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A)	4,3	4,5	3,6	1,3	2,75	2,3
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A) im Transwell	1,07	1,05	0,87	0,64	0,9	0,58

#### **3.4.4 Tumorstammzell-Induktion wird über NKG2D und DNAM-1 vermittelt**

Bei der Kokultur von MCF-7-Zellen und NK-Zellen unter dem Einfluss von Concanamycin A war die Möglichkeit jeglicher Zell-Zell-Interaktionen gegeben, ohne dass Zielzellen getötet wurden. Tumorstammzellen konnten beim Killing somit nicht mehr durch Selektion angereichert werden, sondern lediglich durch Induktion entstehen. Nach der zusätzlichen Blockade der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 war die Menge der induzierten CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen jedoch nicht auf gleichem Niveau bzw. zusätzlich erhöht, sondern um ca. 40% vermindert (von 2,45% auf 1,49% TSZ) (Abb. 17). Daraus lässt sich folgern, dass diese NK-Zell-Rezeptoren die Signalvermittlung zur Induktion neuer Tumorstammzellen unterstützen.



**MCF-7 Kontrolle**

**MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A)**

**MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A und NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern)**

**Abb. 17: Tumorstammzellanteil von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen unter Einsatz von Concanamycin A und NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern**

Durchflusszytometrische Analysen zur Bestimmung des TSZ-Anteils unter verschiedenen Bedingungen. Native MCF-7-Zellen (**links**), MCF-7-Zellen nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen (**Mitte**) und MCF-7-Zellen nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen, deren NKG2D- und DNAM-1-Rezeptoren zusätzlich geblockt waren (**rechts**).

**Tab. 10: Tumorstammzellanteil [%] von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen, die mit Concanamycin A und NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern inkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrolle (n=6)**

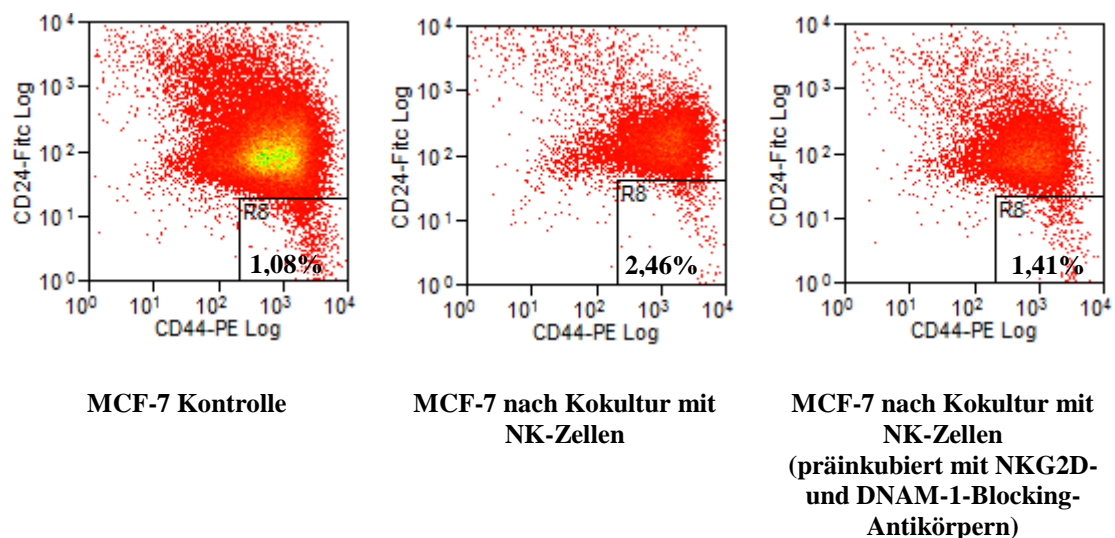
<b>TSZ-Anteil [%]</b>						
MCF-7 Kontrolle	0,65	0,65	0,7	0,11	0,71	0,6
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A)	2,45	1,94	1,3	0,45	0,77	1,3
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A und NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern)	1,49	1,51	0,86	0,27	0,6	0,86

Im Anschluss an diese Erkenntnis untersuchten wir das Verhalten von MCF-7-Brustkrebszellen unter alleiniger Blockade von NKG2D- und DNAM-1-Rezeptoren auf NK-Zellen ohne den Einsatz von Concanamycin A. Diese NKG2D- und DNAM-1-



blockierten NK-Zellen waren ebenso wenig wie Concanamycin A-behandelte NK-Zellen in der Lage, Tumorzellen zu lysieren. So bestand auch in diesem Versuch kein Selektionsvorteil für Tumorzellen mit geringerer NK-Zell-Liganden-Expression, welcher den Tumorstammzellanteil nach einem Angriff durch NK-Zellen hätten anheben können. Wie erwartet führte die Kokultur aus MCF-7-Zellen und Rezeptor-blockierten NK-Zellen lediglich zu einer sehr geringen Anreicherung von CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen (von 1,08% auf 1,41% TSZ) (Abb. 18). In Relation zur Kontrolle, also zu Tumorzellen, die eine Kokultur mit unbehandelten NK-Zellen überlebt hatten (2,46% TSZ), ergab sich, ähnlich wie unter dem Einsatz von Concanamycin A, ein um über 40% verminderter Tumorstammzellanteil.

Die Blockade von MHC1-Molekülen auf MCF-7-Zellen im Rahmen eines Angriffs durch NK-Zellen erbrachte keine einheitlichen und zielführenden Ergebnisse.



**Abb. 18:** Tumorstammzellanteil von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen unter Einsatz von NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern

Durchflusszytometrische Analysen zur Bestimmung des TSZ-Anteils unter verschiedenen Bedingungen. MCF-7-Kontrollpopulation (**links**), MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen (**Mitte**) und MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen, deren NKG2D- und DNAM-1-Rezeptoren geblockt waren (**rechts**).

**Tab. 11: Tumorstammzellanteil [%] von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen, die mit NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern präinkubiert wurden, im Vergleich zur Kontrolle (n=4)**

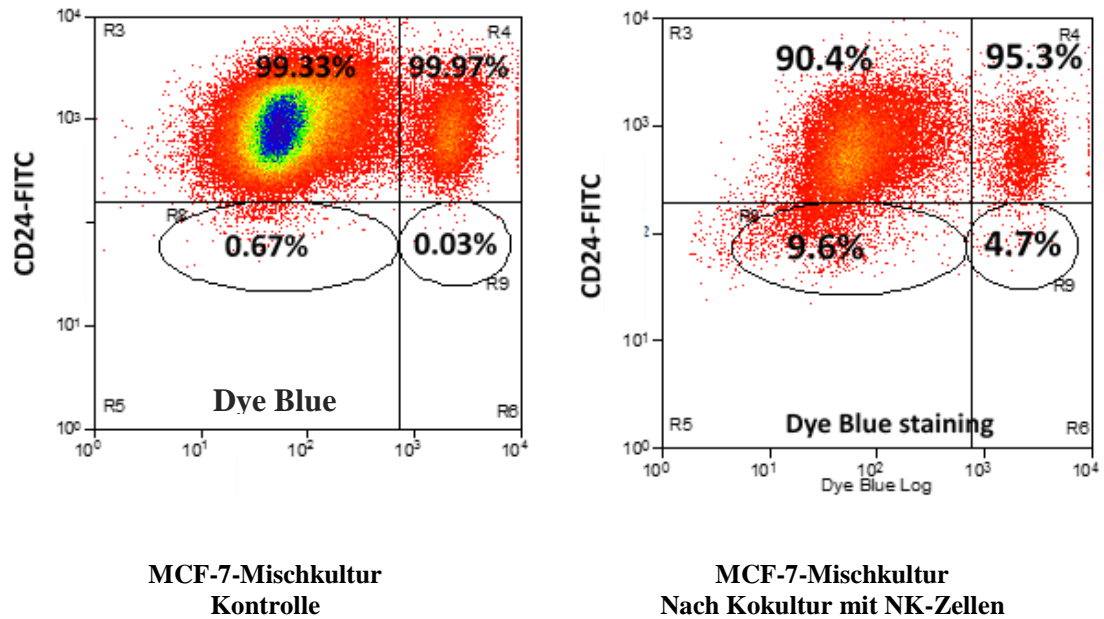
TSZ-Anteil [%]				
MCF-7 Kontrolle	1,08	0,65	0,7	0,8
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen	2,46	0,76	0,26	1,35
MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern)	1,41	0,52	0,22	1,55

Folglich scheint die Blockade der aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2D- und DNAM-1 beide dargestellten Möglichkeiten zur Anreicherung von Tumorstammzellen, demnach sowohl die Selektion als auch die Induktion, weitgehend, aber nicht vollständig zu unterbinden. Die über diese NK-Zell-Rezeptoren vermittelten Interaktionen spielen also nicht nur für eine Selektion, sondern auch für die Induktion neuer Stammzellen, eine zentrale Rolle.

### **3.5 Induktion und Selektion sind zwei nebeneinander existierende Mechanismen zur Tumorstammzellenanreicherung**

Um die Zusammensetzung von potentiell selektionierten und induzierten Tumorstammzellen innerhalb einer Population beurteilen zu können, konstruierten wir einen speziellen Killing Assay (siehe 2.2.8). Stammzelldepletierte MCF-7-Zellen wurden mittels intrazellulärer Färbung (Dye-Blue, Dye eFluor 670) markiert und 1:1 mit nativen, ungefärbten MCF-7-Zellen vermischt. Diese Kokultur inkubierten wir mit NK-Zellen. Während Tumorstammzellen der nativen MCF-7-Zell-Population sowohl durch Selektion übrig geblieben, als auch durch Induktion neu entstanden sein konnten, war bei Tumorstammzellen der markierten, stammzelldepletierten MCF-7-Fraktion nur letzteres möglich. Die anschließende durchflusszytometrische Analyse zeigte doppelt so viele ungefärbte, über beide Mechanismen entstandene CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen (9,6%), wie zuvor markierte, ausschließlich de novo hervorgebrachte Tumorstammzellen (4,7%) bei einem ähnlichen Tumorstammzellanteil in den Ausgangspopulationen (0,67% bzw. 0,03%) (Abb. 19). Es besteht also ein 1:1-Verhältnis zwischen bestehenden und

induzierten Tumorstammzellen. So können wir davon ausgehen, dass Selektion (bzw. Präexistenz) und Induktion zwei nebeneinander existierende Mechanismen zur Anreicherung von Tumorstammzellen sind.



**Abb. 19: Anteiliges Verhältnis der Tumorstammzell-Anreicherung durch Selektion und Induktion**

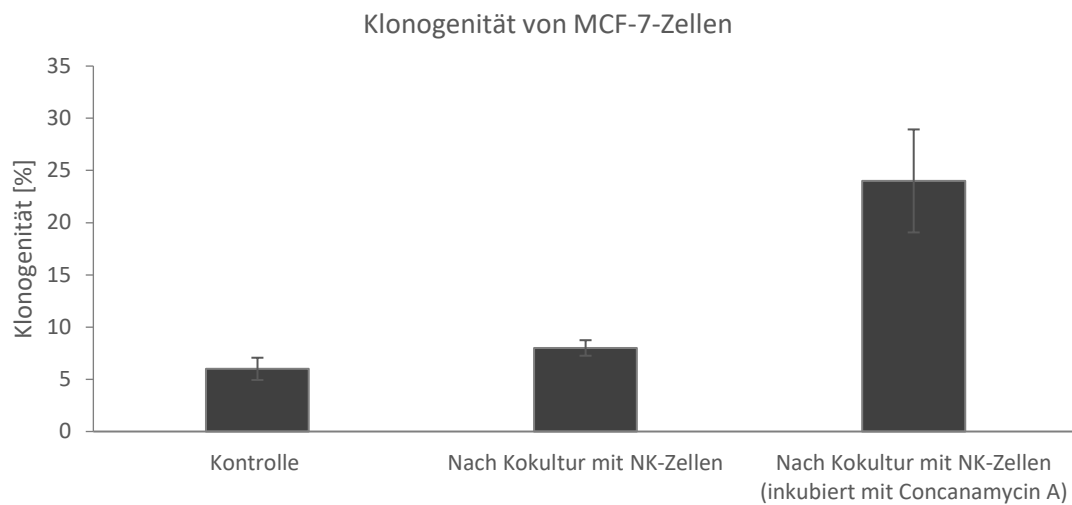
Dargestellt ist die durchflusszytometrische Analyse einer Mischkultur im Verhältnis 1:1 aus nativen MCF-7-Zellen und gefärbten, stammzelldepletierten MCF-7-Zellen **links** vor und **rechts** nach einer Kokultur mit NK-Zellen

**Tab. 12: Tumorstammzellanteil [%] von MCF-7-Zellen aus einer Mischkultur aus nativen sowie stammzelldepletierten MCF-7-Zellen vor und nach einer Kokultur mit NK-Zellen (n=3)**

<b>TSZ-Anteil [%]</b>			
MCF-7 nativ	0,67	0,75	0,83
MCF-7 nativ nach Kokultur mit NK-Zellen	9,6	5,8	3,3
MCF-7 (stammzelldepletiert)	0,03	0,1	0,06
MCF-7 (stammzelldepletiert) nach Kokultur mit NK-Zellen	4,7	3	1,45

### **3.6 Bestehende und induzierte Tumorstammzellen besitzen das gleiche klonogene Potential**

Wir verglichen die Klonogenität, also die Fähigkeit neue Tochterzellen zu generieren, von nativen MCF-7-Zellen mit MCF-7-Zellen, die unter verschiedenen Bedingungen eine Kokultur mit NK-Zellen überlebt hatten. Während die native MCF-7-Zell-Population mit geringem Tumorstammzellanteil relativ wenige Kolonien bildete (ca. 6%) war die Klonogenität von immunresistenten Tumorzellen, die laut dem vorigen Versuch (3.5) zur Hälfte potentiell selektionierte und zur anderen Hälfte induzierte Tumorstammzellen enthalten sollten, höher (ca. 8%). Vor allem der Einsatz von Concanamycin A als Inhibitor der NK-Zell-Lyse und Mittel zur Stammzellinduktion erbrachte, nach der Aussaat der immunresistenten MCF-7-Zellen, eine deutlich höhere Anzahl neu gebildeter Kolonien (ca. 24%) (Abb. 20).



**Abb. 20: Klonogenität von MCF-7-Zellen**

Je 50 MCF-7-Zellen wurden in einer Platte ausgesät. Nach 2-3 Wochen Inkubation wurden die neu gebildeten Kolonien gezählt. Dargestellt ist die Anzahl der Kolonien aus nativen MCF-7-Zellen (Kontrolle) (**links**), aus MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen (**Mitte**) und aus MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen (präinkubiert mit Concanamycin A) (**rechts**).

Unter Berücksichtigung des Tumorstammzellanteils der ausgesäten MCF-7-Populationen (siehe 3.4.3, MCF-7 nativ (Kontrolle): 0,89% TSZ, MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen: 1,39% TSZ, MCF-7 nach Kokultur mit NK-Zellen präinkubiert mit Concanamycin A: 4,3% TSZ) errechneten wir für alle drei Versuchsansätze einen Faktor von  $6 \pm 0,5$  zur Entstehung neuer Kolonien aus Tumorstammzellen. Wir nehmen also an, dass bestehende und induzierte Tumorstammzellen das gleiche tumorigene Potential besitzen und eine mit ihrem Anteil in der Ausgangspopulation korrelierende Menge neuer Kolonien hervorbringen können.

#### 4 Diskussion

Seit der Identifizierung von Brustkrebsstammzellen als treibende Kraft der Tumorentstehung und -progression [10] befassen sich Wissenschaftler mit der Charakterisierung und Wirkungsweise dieser speziellen Subpopulation. Vor allem ihre Resistenz gegenüber medizinischen Therapieansätzen bzw. das Unterlaufen der körpereigenen Immunantwort sind Teil aktueller Forschungsaspekte. F. Reim und Kollegen zeigten, dass Brustkrebszellen, die eine Kombinationsbehandlung mit dem monoklonalen Antikörper Trastuzumab und NK-Zellen im Rahmen einer ADCC überlebt hatten, nach der Aussaat in Form von Mammosphären wuchsen und in der durchflusszytometrischen Analyse einen höheren Anteil an stammzelltypischen CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen aufwiesen als zuvor. Diese Brustkrebsstammzellen zeichneten sich durch eine herunterregulierte Her2-Expression aus im Vergleich zu den übrigen Zellen [21]. Anknüpfend an diese Erkenntnis untersuchten wir das Verhalten von Brustkrebszellen nach einem Angriff durch NK-Zellen ohne Antikörper-vermittelte Zelltoxizität. Dazu konzentrierten wir uns ebenfalls auf Zellen der Linie MCF-7 und zogen teilweise andere Brustkrebslinien hinzu. NK-Zellen stammten aus dem Blut gesunder Spender, die aufgrund unterschiedlicher Donoren auch in ihrer Funktion geringfügig differierten. Diese Tatsache hatte aber keinen Einfluss auf die Qualität der Ergebnisse. Alle Resultate basieren auf *in vitro* durchgeführten Versuchen. Wir konnten mit einer Konsistenz von 100% bestätigen, dass MCF-7-Brustkrebszellen, die eine Kokultur mit NK-Zellen überstanden hatten, auch ohne die Hinzunahme des Antikörpers Trastuzumab eine Anreicherung an CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Zellen zu verzeichnen hatten (Abb. 6). Bei einem p-Wert von 0,01692881 können wir von einem signifikanten Ergebnis sprechen. Die Inkubation von Tumorzellen mit zytokinhaltigem Überstand aktivierter NK-Zellen hatte jedoch keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der Tumorzellpopulation ( $p = 0,24$ ) (Abb. 7). Ob lösliche Mediatoren (wie IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und andere Faktoren) in zu geringer Konzentration vorlagen oder an sich keinen relevanten Beitrag zur vermehrten Existenz von Tumorstammzellen leisteten bleibt dabei außer Betracht. Wang et al. zeigten im Einklang dazu, dass IFN- $\gamma$ -Rezeptoren auf Brustkrebsstammzellen in gleichem Maße exprimiert werden wie auf Nichtstammzellen [32]. Zwar wurde eine Stammzellinduktion mittels Überstand einer gemischten Lymphozytenreaktion bzw. einer Kombinationsbehandlung aus TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  und TNF-

$\alpha$  bereits beschrieben [37], dies erlaubt jedoch keine Aussage über den Einfluss einzelner Faktoren. In unseren Versuchen scheint der direkte Kontakt mit Immunzellen für die Tumorstammzell-Anreicherung von essentieller Bedeutung zu sein.

Die immunvermittelte Tumorstammzell-Anreicherung gab Anlass dazu, die Mechanismen dieses „Immune Escape“-Phänomens näher zu untersuchen. So hinterfragten wir, über welche Strategien Tumorstammzellen es schaffen, einer Immunantwort durch NK-Zellen zu entkommen.

Ein möglicher „Immune Escape“-Mechanismus ist die Selektion resistenter Tumorzellen, die durch NK-Zellen nicht hinreichend lysiert werden können und daher vermehrt übrig bleiben. Im Rahmen eines Immunoediting-Prozesses wurde eine Herunterregulation von Oberflächenantigenen auf Tumorzellen sowohl für Her2 [21] als auch für andere Strukturen schon häufig beobachtet [31]. Anhand durchflusszytometrischer Analysen konnten wir demonstrieren, dass MCF-7-Stammzellen ( $CD44^{high}CD24^{low}$ ) eine geringere Expression der NK-Zell-aktivierenden NKG2D-Liganden (*MICA*, *MICB* und *ULBP2*) und DNAM-1-Liganden (*CD112* und *CD155*) besitzen als Nichtstammzellen ( $CD44^{high}CD24^{high}$ ) (Abb. 8). Signifikanzberechnungen zeigten für Unterschiede dieser Oberflächenproteine auf Tumorstammzellen und Nichtstammzellen p-Werte zwischen 0,0005 und 0,3. Die große Spannweite lässt sich zum einen durch einen relativ kleinen Stichprobenumfang ( $n=3$ ) sowie durch schlecht beeinflussbare Unterschiede in der Kultivierung der Tumorzellen erklären. So waren einzelne Versuche nicht immer gut miteinander zu vergleichen. In Anbetracht der Tendenz der p-Werte erlaubten wir uns jedoch die oben dargestellten Vermutungen zur NK-Zell-Ligandenmodulation anzustellen. Dies legt eine Selektion nahe, die durch das vermehrte Überleben von Tumorstammzellen mit reduzierten Angriffspunkten für zytotoxische NK-Zellen zu erklären ist. Auch für die Zelllinien SKBR-3, BT-474 und MDA-MB-231 beobachteten wir die verminderte Expression spezieller NK-Zell-Liganden auf Tumorstammzellen mit unterschiedlichen Signifikanzmustern. Einzig DNAM-1-Liganden der Linie MDA-MB-231 schienen ihre Expression gegenteilig zu regulieren, wobei in dieser Linie unklar ist, inwiefern die Markerkombination  $CD44^{high}CD24^{low}$  tatsächlich zur Definition einer Tumorstammzellpopulation geeignet ist [41]. So war jede Zelllinie durch ein individuell reguliertes Oberflächenmuster ausgestattet, welches ihr die Möglichkeit bietet, auf speziellem Wege einer Lyse durch NK-Zellen zu entgehen. Die

durchflusszytometrisch ermittelte MHC1-Expression auf Tumorstammzellen der untersuchten Brustkrebszelllinien MCF-7, SK-BR-3, BT-474 und MDA-MB-231 war durchweg niedriger als auf Nichtstammzellen (Abb. 8 bis Abb. 12). Da MHC1-Moleküle inhibitorische Signale an NK-Zellen vermitteln, ist ihre Herunterregulation auf Tumorstammzellen zunächst nicht als Überlebensvorteil einzuordnen. Bestehenden Beschreibungen zufolge wurde dieses Phänomen jedoch für fortgeschrittene Tumoren des Öfteren beschrieben und könnte Bestandteil des wenig differenzierten Stammzellphänotyps sein bzw. Schutz vor CD8<sup>+</sup> T-Zellen bieten, die Tumorantigene nur erkennen, wenn sie auf MHC Klasse 1-Molekülen präsentiert werden [42]. Die mRNA-Analyse von NKG2D- und DNAM-1-Liganden in nativen und 6-fach selektionierten MCF-7-Zellen erbrachte ein mit der Ausprägung der zuvor durchflusszytometrisch dargestellten Oberflächenstrukturen gut zu vereinbarendes Resultat. Auf Ebene des Transkriptoms zeigten sich die gleichen Expressionsunterschiede der untersuchten Oberflächenrezeptoren zwischen Tumorstammzellen und Nichtstammzellen wie sie zuvor durchflusszytometrisch ermittelt wurden. 6-fach selektionierte MCF-7-Zellen wiesen etwas weniger deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen Tumorstammzellen und Nichtstammzellen auf, ließen jedoch auch insgesamt höhere Ct-Werte als native MCF-7-Zellen erkennen. Anhand der Standardabweichungen bei n=3 können hier Rückschlüsse auf die Streuung der Ergebnisse gezogen werden. Wang et al. bestätigten eine Immunoselektion von Brustkrebsstammzellen durch die Herunterregulation der Oberflächenproteine MICA und MICB, reduzierte IFN- $\gamma$ -Induktion und die konsekutiv verminderte Lyse durch NK-Zellen, konnten jedoch keine Veränderungen auf mRNA-Ebene nachweisen. In vivo zeigten sie eine damit einhergehende, vermehrte Metastasierung [32]. De Kruijf et al. fanden heraus, dass die Ausprägung der einzelnen NKG2D-Liganden auf Brustkrebszellen unterschiedliche Auswirkungen auf die Prognose der Patienten hat. Dabei käme es weder auf die Anzahl unterschiedlicher NKG2D-Liganden noch auf das Expressionsausmaß im Gesamten an. Vor allem eine niedrige MICA-, MICB- und ULBP2-Expression auf Brustkrebszellen bzw. deren Kombination (die MCF-7-Stammzellen in unseren Versuchen aufzeigten) ginge mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für Rezidive einher [33]. Unsere Ergebnisse zusammengenommen mit Erkenntnissen anderer Forschungsgruppen sprechen also für eine Selektion von Brustkrebsstammzellen mit individuell verminderter NK-Zell-



Liganden-Expression nach einer Kokultur mit NK-Zellen.

Ein anderer „Immune Escape“-Mechanismus von Brustkrebszellen könnte die aktive Induktion von Tumorstammzellen aus Nichtstammzellen durch „Epithelial-mesenchymale Transition“ (EMT) sein, welche sich dann durch einen resistenteren Phänotyp mit dem Potential zur Selbsterneuerung, Differenzierung und Migration auszeichnen. Neben diesen Eigenschaften zeigen Tumorstammzellen Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika und ionisierender Strahlung [16] und haben die Fähigkeit ihr immunogenes Mikromilieu selbst zu beeinflussen [37]. Die „de novo“-Generierung von Tumorstammzellen nach einer Kokultur mit NK-Zellen konnten wir belegen. Aus einer stammzelldepletierten MCF-7-Population ließ sich nach der Kokultur mit NK-Zellen durchflusszytometrisch in 10 von 10 Versuchen eine CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup>-Population deutlich abgrenzen ( $p = 0,00045334$ ) (Abb. 14). Schon Mani et al. beobachteten einen Zusammenhang zwischen der Bildung neuer Tumorstammzellen aus einst differenzierten Brustkrebszellen und einer EMT. Sie beschrieben eine Hochregulation EMT-relevanter Marker in Tumorstammzellen im Vergleich zu Nichtstammzellen. Das Einbringen dieser EMT-relevanten Transkriptionsfaktoren in stammzelldepletierte Brustkrebszellen führte zur Generierung neuer Tumorstammzellen [13]. Für CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und TGF- $\beta$  wurde eine EMT-Auslösung mit Hochregulation dieser EMT-Marker in Tumorzellen bereits nachgewiesen [16], [13]. Um den Zusammenhang zwischen induzierten Tumorstammzellen nach NK-Zell-Kontakt und einer EMT darzustellen, demonstrierten wir mittels quantitativer Real-Time-PCR die mRNA-Herunterregulation des epithelialen Adhäsionsmoleküls *E-Cadherin* sowie eine Hochregulation mesenchymaler Marker wie des Strukturproteins *Vimentin*, der EMT-auslösenden Transkriptionsfaktoren *Slug*, *Snail* und *Twist*, und der stammzelltypischen Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *KLF4* und *cMyc* (Abb. 15). Folglich sind neu entstandene Tumorstammzellen nach einer Kokultur mit NK-Zellen aus differenzierten Nichtstammzellen via EMT hervorgegangen. Für einen detaillierteren Einblick müsste die Expression EMT-relevanter Gene zwischen bestehenden und rein induzierten Tumorstammzellen verglichen werden.

Weiterführend stellten wir uns die Frage, wie das anteilige Verhältnis zwischen bereits vorhandenen, ggf. selektionierten Tumorstammzellen und durch EMT induzierten Tumorstammzellen nach einem Angriff durch NK-Zellen aussieht. Dazu beabsichtigten

wir, durch den Einsatz des Makrolid-Antibiotikums Concanamycin A, die NK-Zell-abhängige Lyse von Tumorzellen zu unterbinden. So würde ein Selektionsvorteil von Tumorstammzellen mit verminderter Oberflächenexpression der aktivierenden NKG2D- bzw. DNAM-1-Liganden zunichte gemacht und  $CD44^{high}CD24^{high}$ - sowie  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Zellen gleichermaßen überleben. Eine Tumorstammzell-Anreicherung nach dem Kontakt zu Concanamycin A-behandelten NK-Zellen wäre also nur durch die Induktion neuer Stammzellen zu erklären. In Erwartung eines reduzierten Tumorstammzellanteils aufgrund der fehlenden angenommenen Selektion und alleinigen Induktion von  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Zellen wurden wir vom Gegenteil überrascht. In Gegenwart funktionell inhibierter NK-Zellen war eine noch deutlichere Vergrößerung der Tumorstammzellpopulation zu beobachten als bei der Kokultur von MCF-7-Zellen mit unbehandelten NK-Zellen. Der Befund ließ sich in fünf von sechs Experimenten reproduzieren. Aufgrund schlechter Vergleichbarkeit der einzelnen Variablen wurde hier eine Datentabelle angelegt und auf weitere Signifikanzberechnungen verzichtet. Dies lässt vermuten, dass gerade andauernde Kontakte zwischen MCF-7-Zellen und NK-Zellen, die normalerweise zur Lyse der Tumorzelle führen würden, bei ausbleibender Lyse die Induktion von Stammzeleigenschaften ermöglichen. Einen Einfluss löslicher Faktoren bzw. Zytokine konnten wir mittels einer trennenden Membran auch hier ausschließen (Abb. 16). Wir stellten also fest, dass der direkte Kontakt zwischen Tumorzellen und ineffizienten NK-Zellen bevorzugt zu einer Induktion von Tumorstammzellen führt. Ob Selektion hier wirklich einen Beitrag zur Stammzellenanreicherung leistet, wird bei diesem Versuchsaufbau nicht analysiert.

Welche Rolle spielen die NKG2D- und DNAM-1-Signalwege für die nicht-lytische Interaktion zwischen Tumorzellen und NK-Zellen? Um dies zu überprüfen, blockierten wir die Rezeptoren ineffizienter NK-Zellen zusätzlich mit Antikörpern gegen NKG2D und DNAM-1 und kultivierten sie wiederum mit MCF-7-Zellen. Dies resultierte in einem um ca. 40% verminderten Tumorstammzellanteil gegenüber der Stammzellpopulation nach Kokultur mit nur Concanamycin A-behandelten NK-Zellen (Abb. 17). Derartige Ergebnisse wurden in sechs von sechs Versuchen erzielt. Auch die alleinige Blockade von NKG2D und DNAM-1 auf NK-Zellen, die deren Zytotoxizität ebenso unterband und somit einen Selektionsvorteil von vorhandenen Tumorstammzellen ausschloss, führte zu einer um über 40% verminderten Tumorstammzellenanreicherung im Vergleich zu MCF-7-

Zellen nach Kokultur mit unbehandelten NK-Zellen (in drei von vier Versuchen) (Abb. 18). Die Ergebnisse waren größtenteils reproduzierbar, Datentabellen wurden angelegt. Signifikanzberechnungen hielten wir bei unterschiedlichen Versuchsbedingungen auch hier nicht für sinnvoll. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Interaktion über die NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 relevant für die Signalvermittlung einer EMT-Induktion ist. Unterstützende Ergebnisse von Cai et al. zeigen, dass NKG2D sogar die Fähigkeit besitzt, die Induktion von Tumorstammzellen via EMT zu stimulieren [43]. Da durch die Rezeptorblockade jedoch kein im Vergleich zur MCF-7-Ausgangspopulation verringerter Prozentsatz an Tumorstammzellen erreicht wurde, scheint die Interaktion über NKG2D und DNAM-1 nur einen partiellen Beitrag zur Signalvermittlung einer EMT zu leisten. Möglich erscheint in erster Linie ihre stabilisierende Funktion bei der Ausbildung der immunologischen Synapse zwischen Tumorzelle und NK-Zelle (Abb. 2).

Eine Blockade von MHC1-Molekülen auf MCF-7-Zellen im Rahmen einer Kokultur mit NK-Zellen brachte keine signifikanten Veränderungen der Tumorstammzellpopulation mit sich. Bezüglich dessen wurde berichtet, dass inhibitorische Einflüsse von MHC1-Molekülen auf Tumorzellen durch die Signale von NKG2D-Liganden an NK-Zellen überschrieben werden [44], sodass ihre Relevanz bei Anwesenheit von NKG2D-Liganden eingeschränkt ist.

Um das anteilige Verhältnis zwischen evt. selektionierten und induzierten Tumorstammzellen innerhalb einer MCF-7-Population nach der Kokultur mit NK-Zellen dennoch darzustellen, konstruierten wir einen speziellen Killing Assay. Dabei wurden native sowie stammzelledepletierte MCF-7-Zellen zunächst markiert, dann gemischt und zusammen mit NK-Zellen kultiviert. Anhand durchflusszytometrischer Analysen ergab sich in der stammzelledepletierten Population, in der Tumorstammzellen nur durch Induktion hervorgebracht werden konnten, ein etwa halb so großer Anteil an Tumorstammzellen wie in der nicht-depletierten Fraktion, in der zusätzlich zur Induktion auch eine Anreicherung der initial vorhandenen Tumorstammzellen durch Selektion auftreten konnte (Abb. 19). Hierbei zeigten drei von drei Versuche eine gleichartige Verteilung der  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Zellen vor und nach einem Killing-Angriff durch NK-Zellen auf, die in einer Datentabelle zusammengefasst wurden. Die oben aufgeführte Tatsache, dass Tumorstammzellen weniger oberflächliche Angriffspunkte für NK-Zellen

exprimieren und dass in diesem Experiment die Anwesenheit initial vorhandener Tumorstammzellen zu einem doppelt so hohen Anteil an Tumorstammzellen führt wie in der stammzelldepletierten Fraktion, legt nahe, dass ein überdurchschnittlich gutes Überleben von Tumorstammzellen unter NK-Zell-vermitteltem Selektionsdruck auch zum „Immune Escape“ beitragen kann. Folglich gehen wir davon aus, dass Selektion und Induktion zwei nebeneinander existierende Mechanismen sind, die beide zur Tumorstammzellenanreicherung nach einem Angriff durch NK-Zellen beitragen. Die Gegebenheit, dass in dieser Arbeit insbesondere das Phänomen der immunvermittelten Induktion von Tumorstammzellen untersucht wurde, ist nicht als Wertung hinsichtlich der jeweiligen Bedeutung von Induktion und Selektion zu verstehen.

Des Weiteren beobachteten wir wie auch andere Wissenschaftler [13], dass initial bestehende und induzierte Tumorstammzellen das gleiche Potential zur Bildung neuer Kolonien besitzen (Abb. 20).

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, fällt auf, dass die Interaktion über NKG2D und DNAM-1 auf NK-Zellen sowohl für die Selektion als auch für die Induktion von Tumorstammzellen eine zentrale Rolle spielt. Ein Angriff durch NK-Zellen, der zur Abtötung von Tumorzellen führen kann, scheint also gleichzeitig verschiedene Prozesse in Gang zu setzen, durch die Tumorzellen versuchen einer Immunantwort zu entkommen. Zu diesen „Immune Escape“-Mechanismen gehören, wie oben dargestellt, die Selektion bestehender Tumorstammzellen mit einer verminderten Expression aktivierender NK-Zell-Liganden sowie die Induktion neuer Tumorstammzellen via EMT im Sinne einer Dedifferenzierung. Mamessier et al. entdeckten außerdem einen direkten Effekt auf NK-Zellen. Nach dem Kontakt zu Brustkrebszellen regulierten auch sie ihre NKG2D- und DNAM-1-Rezeptoren herunter und waren in ihrer Zytotoxizität deutlich eingeschränkt [23]. Cai et al. fanden heraus, dass einige Tumorzellen selbst NKG2D exprimieren und sich so über Zell-Zell-Kontakte untereinander stimulieren können. Sie zeigten, dass eine NKG2D-Expression mit dem stammzelltypischen Phänotyp  $CD44^{high}CD24^{low}$  sowie dem Nachweis der EMT-relevanten Transkriptionsfaktoren assoziiert ist und mit einem schlechteren klinischen Outcome einhergeht [43]. So scheint eine NKG2D-vermittelte EMT und Generierung von Tumorstammzellen in gewissem Maße auch ohne die Anwesenheit von NK-Zellen möglich zu sein.

Von großem medizinischem Interesse ist natürlich, inwiefern die dargestellten

„Immune Escape“-Mechanismen von Brustkrebszellen, vor allem im Hinblick auf die Relevanz der NKG2D- und DNAM-1-Rezeptoren bzw. ihrer Liganden, Angriffspunkte für therapeutische Interventionen bieten. Der aktuelle Stand der Wissenschaft geht davon aus, dass Tumorinitiation und Rezidive durch die relativ spärlich vorhandenen Tumorstammzellen verursacht werden [16]. Die effektivste Möglichkeit zur Tumorbekämpfung wäre also, neben der Reduktion der Haupttumormasse durch konventionelle Therapieschemata, diese Tumorstammzellen zu eliminieren. Zielgerichtete Therapieansätze gegen Tumorstammzellen existieren in großer Vielfalt, fanden bisher jedoch keine klinische Anwendung. So konnten typische Oberflächenmarker wie CD44, ALDH oder ABC-Transporter zur Antikörpervermittelten Zelltoxizität herangezogen werden. Auch eine Kombinationstherapie aus Trastuzumab und Pertuzumab gegen den Wachstumshormonrezeptor Her2 traf vermehrt Tumorstammzellen im Vergleich zu einer Monotherapie mit Trastuzumab [45]. Diessner et al. zeigten ebenfalls eine verstärkte Vernichtung von Tumorstammzellen durch die Behandlung mit einem Fusionsprotein aus Trastuzumab und dem Zytostatikum Emtansine (T-DM1) [46]. Ein anderer Ansatzpunkt ist die Induktion einer Differenzierung von Tumorstammzellen zu epithelialen Zellen, die für bestehende Therapieschemata (z.B. Zytostatika und Bestrahlung) leichter zugänglich sind. Für Histon-deacetylase-Inhibitoren (HDCA-Inhibitoren), All-trans-Retinoinsäure (ATRA) und das Antibiotikum Salinomycin wurden günstigere Verläufe in Tumorpatienten beschrieben [32], [47]. Mit der Vorstellung eines hierarchischen Modells der Tumorentstehung (siehe 1.2.1), zielen diese Therapieansätze jedoch nur auf die Eliminierung vorhandener Tumor-initiiierenden Zellen ab. Der Nachweis einer EMT und der Induktion neuer Tumorstammzellen stellt dieses hierarchische Modell der Tumorentstehung in Frage, da auch epitheliale Tumorzellen via EMT in der Lage sind, einen neuen Tumor zu generieren bzw. die Proliferation des Tumorgewebes zu fördern. Die ständige Produktion neuer Tumorstammzellen legt nahe, direkt in diesen EMT-gesteuerten Prozess einzugreifen. Dies könnte durch die Intervention in TGF- $\beta$ -vermittelte Signalwege geschehen [47] oder durch das Unterbinden der von uns nachgewiesenen Interaktionen über NKG2D und DNAM-1 zwischen Brustkrebszellen und NK-Zellen. Da die Aktivierung dieser Rezeptoren maßgeblich zur Lyse von Tumorzellen beiträgt und sowohl eine hohe Expression von NKG2D auf NK-Zellen als

auch derer Liganden MICA/B und ULBP1-3 auf Tumorzellen mit einer starken Tumorabwehr einhergehen [33], ist eine NKG2D-Blockade zur Unterbindung einer EMT als zweifelhaft anzusehen. Verschiedene Formen der Immuntherapie wurden genutzt, um die Tötung von Tumorzellen über NKG2D und deren Liganden zu fördern, allerdings ohne Berücksichtigung der gleichzeitigen Anreicherung von Tumorstammzellen. Es konnte gezeigt werden, dass der Transfer autologer und allogener NK-Zellen zu einer verbesserten Tumorbekämpfung führt. Auch die Depletion regulatorischer T-Zellen verstärkt die Tumorlyse durch NK-Zellen [28]. Außerdem können NKG2D-induzierende Zytokine (z.B. IL-2) zur Verstärkung der NK-Zell-Zytotoxizität eingesetzt werden [48]. Diese Immuntherapien sollten im Hinblick auf das „Immune Escape“-Phänomen von Tumorstammzellen modifiziert werden. Der therapeutische Einsatz von All-trans-Retinoidsäure (ATRA) induziert die Differenzierung von Tumorstammzellen zu epithelialen Zellen und fördert in dem Sinne die Hochregulation von MICA und MICB, was sie zudem sensibler für eine NKG2D-abhängige Immunantwort durch NK-Zellen macht. Dies führt zu einer gesteigerten Tumorlyse durch NK-Zellen und weniger stammzellbedingten Metastasen in Brustkrebspatientinnen [32]. Raab et al. entwickelten ein NKG2D-Fc-ADCC-Fusionsprotein, welches NKG2D-Liganden auf Tumorzellen bindet und (ähnlich wie Trastuzumab) eine NK-Zell-abhängige ADCC ermöglicht [49]. Auf diese Weise könnten Tumorzellen weiterhin durch NK-Zellen lysiert werden, jedoch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zur Vermittlung einer EMT aufbauen. Eine weitere Möglichkeit ist, die Verwendung von NKG2D-besetzten T-Zellen zur Tötung von Tumorzellen [48], was ebenso die Induktion von Tumorstammzellen durch eine EMT umgehen könnte. Ob die zuletzt genannten Therapieansätze zur Tötung von Tumorzellen über NKG2D wirklich in die Signalwege einer EMT eingreifen und die Induktion von Tumorstammzellen unterbinden können, gilt es weiterhin zu erforschen. Fest steht, dass für eine effektive und nachhaltige Tumorelimination eine Kombinationstherapie ratsam wäre, die sowohl die Haupttumormasse (überwiegend bestehend aus differenzierten, epithelialen Zellen) reduziert (z.B. durch konventionelle Zytostatika, Radiatio, Endokrine Therapie, Immuntherapie usw.), als auch die zielgerichtete Beseitigung bestehender Tumorstammzellen anstrebt (z.B. ADCC über spezielle Oberflächenstrukturen, ATRA) sowie eine EMT-gesteuerte

Stammzellinduktion verhindert (evt. TGF- $\beta$ -Inhibition, NKG2D-Fc-ADCC-Fusionsprotein, NKG2D-besetzte T-Zellen).

## 5 Zusammenfassung

Tumorstammzellen scheinen das Triebwerk für die Initiierung und Progression des Mammakarzinoms zu sein. Durch ihr Potential zur Proliferation von Tumorgewebe, zur Metastasierung und zur Bildung von Rezidiven bestimmen sie maßgeblich die Prognose und Mortalität von Brustkrebspatientinnen. Diese Arbeit demonstriert, welche Mechanismen sich Brustkrebsstammzellen zu Nutze machen, um einer Immunantwort durch NK-Zellen zu entkommen.

Mittels durchflusszytometrischer Analysen konnte innerhalb der Gesamtpopulation an MCF-7-Brustkrebszellen eine  $CD44^{high}CD24^{low}$ -Subpopulation, die dem Tumorstammzellanteil entspricht, abgegrenzt werden. Im Vergleich zur Ausgangspopulation war nach einer Kokultur mit aktivierten NK-Zellen gesunder menschlicher Spender eine Anreicherung von Tumorstammzellen *in vitro* zu verzeichnen. Die Inkubation von Brustkrebszellen mit NK-Zell-Überstand führte zu keiner wesentlichen Veränderung der Tumorstammzellpopulation, was die Notwendigkeit eines direkten Zell-Zell-Kontakts impliziert. Diese Tumorstammzellen könnten nach einem Angriff durch NK-Zellen einerseits durch Selektion übrig geblieben sein oder andererseits durch epithelial-mesenchymale Transition (EMT) neu entstanden sein.

Hinweise auf einen Selektionsprozess ließen sich anhand der verminderten Oberflächenexpression von NK-Zell-Liganden auf Tumorstammzellen im Vergleich zu Nichtstammzellen finden. Die untersuchten Brustkrebszelllinien (MCF-7, SKBR-3, BT-474 und MDA-MB-231) besaßen ein jeweils individuell reguliertes Muster der aktivierenden NKG2D-Liganden (*MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*), DNAM-1-Liganden (*CD112*, *CD155*) und von MHC1-Molekülen auf Tumorstammzellen und Nichtstammzellen. Die niedrigere Expression von NK-Zell-Liganden auf Tumorstammzellen lässt auf eine verminderte Angreifbarkeit durch NK-Zellen schließen. Eine Induktion von Tumorstammzellen aus differenzierten epithelialen Tumorzellen via EMT nach einer Kokultur mit NK-Zellen beweisen. Aus einer stammzelldepletierten MCF-7-Population gingen nach dem Kontakt zu NK-Zellen Tumorzellen mit dem Phänotyp  $CD44^{high}CD24^{low}$  de novo hervor. Die Herunterregulation des epithelialen Adhäsionsmoleküls *E-Cadherin* sowie die Hochregulation mesenchymaler Marker wie des Strukturproteins *Vimentin*, der EMT-auslösenden Transkriptionsfaktoren *Slug*, *Snail*



und *Twist*, und der stammzelltypischen Transkriptionsfaktoren *Oct4*, *KLF4* und *cMyc* auf mRNA-Ebene sprachen für eine EMT-getriggerte Induktion von Tumorstammzellen nach einer Kokultur von MCF-7-Zellen mit NK-Zellen.

Desweiteren stellten wir fest, dass der direkte Kontakt zwischen Tumorzellen und NK-Zellen für die Induktion von Tumorstammzellen von großer Bedeutung ist, und zwar auch nach Inhibition des zytotoxischen Effektorpotentials der NK Zellen. Diese Zell-Zell-Interaktionen scheinen von NKG2D und DNAM-1 abhängig zu sein und eine konsekutive Stammzellinduktion via EMT zu beinhalten.

Da aus einer nativen Population nach dem Kontakt zu NK-Zellen ein doppelt so hoher Anteil an Tumorstammzellen hervorging wie aus einer ebenso mit NK-Zellen behandelten stammzelldepletierten Fraktion, ist davon auszugehen, dass ein überdurchschnittlich gutes Überleben von Tumorstammzellen unter NK-Zell-vermitteltem Selektionsdruck auch zum „Immune Escape“ beitragen kann. Hinsichtlich ihrer Klonogenität gab es zwischen bestehenden und induzierten Tumorstammzellen keinen Unterschied. Beide Fraktionen waren in gleichem Ausmaß in der Lage neue Kolonien zu bilden.

Es konnte also gezeigt werden, dass eine EMT-getriggerte Induktion im Sinne eines „Immune Escapes“ von Brustkrebszellen nach dem Kontakt zu NK-Zellen maßgeblich zur Tumorstammzellenanreicherung beiträgt. Ein zusätzlicher Selektionsprozess bestehender Tumorstammzellen kann als wahrscheinlich angenommen werden. Interaktionen über die NK-Zell-Rezeptoren NKG2D und DNAM-1 bzw. deren Liganden auf Tumorzellen scheinen eine Schlüsselrolle zu spielen. Sie könnten als Ansatzpunkt für medizinische Interventionen dienen, die zur Verhinderung einer Tumorstammzellenanreicherung im Mammakarzinom beitragen und somit die Prognose von Brustkrebspatientinnen verbessern.

## 6 English Summary

Tumor stem cells seem to be the engine for initiation and progression of breast cancer. By their potential for unlimited proliferation, dissemination and relapse they largely determine the prognosis and mortality of breast cancer patients. This thesis shows mechanisms breast cancer (stem) cells use to escape from an immune response by NK cells.

Using flow cytometry analysis, we defined a subpopulation of CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> cells corresponding to the tumor stem cell fraction of MCF-7 breast cancer cells. Compared to the native MCF-7 cell population we observed an enrichment of tumor stem cells *in vitro* after co-culture with activated NK cells from healthy human donors. Incubation of breast cancer cells with NK cell supernatant resulted in no significant change, which implies that the observed NK cell-mediated enrichment of the cancer stem cell population depends on direct cell-cell contact. One possibility is that these tumor stem cells could be enriched by selection, i.e. by preferential killing of their more differentiated counterparts. Alternatively, they could arise *de novo* via epithelial to mesenchymal transition (EMT). A selection process was supported by data showing reduced surface expression of NK cell ligands on tumor stem cells compared to non-stem cells. The investigated breast cancer cell lines (MCF-7, SKBR-3, BT-474 and MDA-MB-231) showed a distinctly regulated pattern of activating NKG2D-ligands (*MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*) and DNAM-1-ligands (*CD112*, *CD155*) and of MHC1-molecules on tumor stem cells and non-stem cells. The comparatively lower expression of NK cell ligands suggests a reduced vulnerability of tumor stem cells towards NK cells.

However, we also showed the induction of tumor stem cells from differentiated epithelial tumor cells via EMT. Tumor cells with the phenotype CD44<sup>high</sup>CD24<sup>low</sup> arose *de novo* from a stem cell depleted MCF-7 tumor cell population which was then co-incubated with NK cells. Downregulation of the epithelial cell adhesion molecule *E-cadherin* as well as upregulation of mesenchymal markers such as the structural protein *vimentin*, the EMT-inducing transcription factors *Slug*, *Snail* and *Twist* and the stem cell-typical transcription factors *Oct4*, *KLF4* and *cMyc* on mRNA level indicate an EMT-triggered induction of tumor stem cells after co-culture of MCF-7 with NK cells.

We also found that the direct contact between tumor cells and non-lytic NK cells is of vital importance for the induction of tumor stem cells. These cell-cell interactions

appeared to depend on NKG2D and DNAM-1 and to include a consecutive stem cell induction via EMT.

As the proportion of tumor stem cells after co-culture of native MCF-7 cells and NK cells was almost twice the number of stem cells arisen from an equally treated stem cell depleted fraction we can assume that an above-average survival of tumor stem cells due to selection stress can also contribute to *immune escape*. Regarding their clonogenicity we noticed no difference between existent and induced tumor stem cells. Both fractions possessed the ability to generate new colonies of similar quantity.

Thus, we showed that upon exposure to NK cells EMT-triggered induction considerably contributes to the enrichment of breast cancer stem cells. An additional process of stem cell selection seems to be realistic. Interactions of the NK cell receptors NKG2D and DNAM-1 and its ligands on tumor cells respectively seem to play a key role. The recognition that de-differentiation may represent a previously unrecognized *immune escape* mechanism of breast cancer cells could serve as a starting point for medical interventions, with the aim of preventing stem cell accumulation in breast cancer and thus improving the prognosis of breast cancer patients.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb	Abbildung
ABC	ATP-binding cassette
ACD-A	anticoagulant citrate dextrose solution A
AD	aqua destillata
ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenase
APC	allophycocyanin
ATRA	all-trans retinoic acid
BET	brusterhaltende Therapie
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
cMyc	cellular myelocytomatosis oncogene
CSC	cancer stem cells
Ct	cycle threshold
CTC	circulating tumor cells
DEPC	diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid
DNAM-1	DNAX accessory molecule 1 (CD226)
E	Expression
Ecad	E-Cadherin (ein epitheliales Adhäsionsmolekül)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
Egfl7	EGF-like domain-containing protein 7
EMT	epithelial to mesenchymal transition
FACS	fluorescence-activated cell sorting
Fc	fragment crystallisable
FCS	foetal calf serum
FGF	fibroblast growth factor
FITC	fluorescein isothiocyanate

frw	forward
FSC	forward scatter
GD2	disialoganglioside 2
GM-CSF	granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HAES	Hydroxyethylstärke
HDCA	histone deacetylase
Her2/neu	human epidermal growth factor receptor 2
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
Ig	Immunglobulin
IL-2	Interleukin 2
KIR	killer-cell immunoglobulin-like receptor
KLF4	Krüppel-like factor 4
MACS	magnetic activated cell separation
MET	mesenchymal to epithelial transition
MHC1	major histocompatibility complex 1
MICA/B	major histocompatibility complex class I-related chains A/B
MOPS-Puffer	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure-Puffer
mRNA	messenger ribonucleic acid
NCR1-3	Natural killer cell receptor 1-3
NKp30/44/46	Natural killer cell protein 30/44/46
NKG2D	natural-killer group 2, member D
NKp46	natural killer cell p46-related protein (CD335)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Oct4	octamer binding transcription factor 4
PARP1	poly adenosine diphosphate [ADP] ribose polymerase 1
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PD1	programmed cell death protein 1
PE	phycoerythrin
PRR2	poliovirus receptor related 2
PVR	polio virus receptor
q-PCR	quantitative polymerase chain reaction

rev	reverse
RNA	ribonucleic acid
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
SF/HGF	scatter factor / hepatocyte growth factor
SFI	surface expression
sMICA/B	soluble MICA/B
SSC	side scatter
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
Tab	Tabelle
T-DM1	Trastuzumab Emtansine 1
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNM	tumor, nodes metastases
TSZ	Tumorstammzelle
UICC	union internationale contre le cancer
ULBP1-4	unique long (UL) 16-binding protein 1-4
Vim	vimentin

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Stochastisches und hierarchisches Modell der Tumorentstehung [7] (Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis) .....	4
Abb. 2: Immunologische Synapse, Missing-Self- und Induced-Self-Hypothese [26] (Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis) .....	11
Abb. 3: Tumormunoediting nach Dunn et al. (2002) [30] (Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis) .....	12
Abb. 4: Gewinnung von PBMCs durch Dichtegradientenzentrifugation [40] (bearbeitet, Urheberrechte siehe Anhang Abbildungsverzeichnis) .....	38
Abb. 5: Durchflusszytometrische Ermittlung des Anteils selektionierter und induzierter Tumorstammzellen .....	46
Abb. 6: Tumorstammzell-Population von MCF-7-Zellen vor und nach Kokultur mit NK-Zellen .....	49
Abb. 7: Tumorstammzell-Population von MCF-7-Zellen vor und nach Inkubation mit NK-Zell-Überstand .....	50
Abb. 8: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf MCF-7- Zellen .....	54
Abb. 9: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf MCF-7- Zellen 6x selected .....	55
Abb. 10: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf SKBR-3- Zellen .....	56
Abb. 11: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf BT-474- Zellen .....	57
Abb. 12: Oberflächenexpression (SFI) von NK-Zell-Liganden auf MDA-MB-231-Zellen.....	58
Abb. 13: mRNA-Expression von NK-Zell-Liganden in MCF-7-Zellen (n=3).....	59
Abb. 14: Stammzelldepletion und „de novo“-Synthese von Tumorstammzellen.....	60
Abb. 15: mRNA-Expression von EMT-Markern in MCF-7-Zellen .....	62
Abb. 16: Induktion von MCF-7-Tumorstammzellen nach Kokultur mit Concanamycin A-behandelten NK-Zellen .....	64

Abb. 17: Tumorstammzellanteil von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen unter Einsatz von Concanamycin A und NKG2D-/DNAM-1- Blocking-Antikörpern.....	66
Abb. 18: Tumorstammzellanteil von MCF-7-Zellen nach Kokultur mit NK-Zellen unter Einsatz von NKG2D-/DNAM-1-Blocking-Antikörpern.....	67
Abb. 19: Anteiliges Verhältnis der Tumorstammzell-Anreicherung durch Selektion und Induktion.....	69
Abb. 20: Klonogenität von MCF-7-Zellen.....	71



## Lizenzen zur Verwendung urheberrechtlich geschützter Bilder

### NATURE PUBLISHING GROUP LICENSE

### TERMS AND CONDITIONS

Sep 27, 2017

---

---

This Agreement between Kathrin Becker -- Kathrin Becker ("You") and Nature Publishing Group ("Nature Publishing Group") consists of your license details and the terms and conditions provided by Nature Publishing Group and Copyright Clearance Center.

License Number	4184130557058
License date	Sep 08, 2017
Licensed Content Publisher	Nature Publishing Group
Licensed Content Publication	Nature
Licensed Content Title	Stem cells, cancer, and cancer stem cells
Licensed Content Author	Tannishtha Reya, Sean J. Morrison, Michael F. Clarke and Irving L. Weissman
Licensed Content Date	Nov 1, 2001
Licensed Content Volume	414
Licensed Content Issue	6859
Type of Use	reuse in a dissertation / thesis
Requestor type	academic/educational
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	4
Figures	Figure 4: Two general models of heterogeneity in solid cancer cells.
Author of this NPG article	no
Your reference number	
Title of your thesis / dissertation	NK-Zell-vermittelte Dedifferenzierung von Brustkrebszellen als neuer Resistenzmechanismus
Expected completion date	Jan 2018
Estimated size (number of pages)	96
Requestor Location	Kathrin Becker Rhönstr. 22 Würzburg, Bayern 97080 Germany Attn: Kathrin Becker


### Nutzung von urheberrechtlich geschütztem Bildmaterial

Frau Kathrin Becker, wohnhaft in 97080 Würzburg, erhält die Lizenz zur Weiternutzung von Bildmaterial aus der Promotionsarbeit „Der NK-Zellrezeptor NKG2D als Zielstruktur für eine Antikörper-basierte therapeutische Immunmodulation“ (2008) von der Autorin Frau Dr. Jutta Steigerwald. Im Speziellen geht es um Abbildung 1 auf Seite 12: „Immunologische Synapse, Missing-Self- und Induced-Self-Hypothese“, deren Urheberrechte Frau Dr. Jutta Steigerwald zu eigen sind. Die weitere Verwendung dieses Bildmaterials ist ausschließlich zu wissenschaftlichen Zwecken bestimmt. Einer Darstellung in der Promotionsarbeit mit dem Thema „NK-Zell-vermittelte Dedifferenzierung von Brustkrebszellen als neuer Resistenzmechanismus“ von Kathrin Becker wird zugestimmt. Eine gewerbliche Nutzung wird ausgeschlossen.



Dr. Jutta Steigerwald


## Nature immunology

- **Order detail ID:** 70666736
- **ISSN:** 1529-2908
- **Publication Type:** Journal
- **Volume:**
- **Issue:**
- **Start page:**
- **Publisher:** NATURE PUBLISHING GROUP
  
- **Permission Status:**  **Granted**
- **Permission type:** Republish or display content
- **Type of use:** Thesis/Dissertation

**Order License Id:** 4184210256606

<b>Requestor type</b>	Academic institution
<b>Format</b>	Print, Electronic
<b>Portion</b>	image/photo
<b>Number of images/photos requested</b>	1
<b>Title or numeric reference of the portion(s)</b>	Figure 1: The three Es of cancer immunoediting.
<b>Title of the article or chapter the portion is from</b>	Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape Department of Pathology and Immunology, Center for Immunology, Washington University School of Medicine, 660 South Euclid Avenue, St. Louis, MO 63110, USA.
<b>Editor of portion(s)</b>	Gavin P. Dunn <sup>1</sup> , Allen T. Bruce <sup>1</sup> , Hiroaki Ikeda <sup>1</sup> , Lloyd J. Old <sup>2</sup> & Robert D. Schreiber <sup>1</sup>
<b>Author of portion(s)</b>	
<b>Volume of serial or monograph</b>	3
<b>Issue, if republishing an article from a serial</b>	11
<b>Page range of portion</b>	991-8
<b>Publication date of portion</b>	2002/10/31
<b>Rights for</b>	Main product
<b>Duration of use</b>	Life of current edition
<b>Creation of copies for the disabled</b>	no
<b>With minor editing privileges</b>	no
<b>For distribution to</b>	Worldwide
<b>In the following language(s)</b>	Original language of publication
<b>With incidental promotional use</b>	no
<b>Lifetime unit quantity of new product</b>	Up to 499
<b>Made available in the following markets</b>	education
<b>The requesting person/organization</b>	Kathrin Becker
<b>Order reference number</b>	
<b>Author/Editor</b>	Kathrin Becker
<b>The standard identifier of New Work</b>	Kathrin Becker
<b>The proposed price</b>	0
<b>Title of New Work</b>	NK-Zell-vermittelte Dedifferenzierung von Brustkrebszellen als neuer Resistenzmechanismus
<b>Publisher of New Work</b>	Universitätsfrauenklinik Würzburg
<b>Expected publication date</b>	Jan 2018
<b>Estimated size (pages)</b>	96

## Nature protocols

- **Order detail ID:** 70666740
- **ISSN:** 1754-2189
- **Publication Type:** Journal
- **Volume:**
- **Issue:**
- **Start page:**
- **Publisher:** NATURE PUBLISHING GROUP
  
- **Permission Status:**  **Granted**
- **Permission type:** Republish or display content
- **Type of use:** Thesis/Dissertation

**Order License Id:** 4184210743901

Requestor type	Academic institution
Format	Print, Electronic
Portion	image/photo
Number of images/photos requested	1
Title or numeric reference of the portion(s)	Figure 1 Separation of cord blood with Ficoll before (left tube) and after (right tube) centrifugation.
Title of the article or chapter the portion is from	Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro Newcastle Centre for Cord Blood, North East England Stem Cell Institute and Institute of Human Genetics, Centre for Life, Central Parkway, Newcastle upon Tyne, NE1 3BZ, UK. c.mcguckin@novussanguis.org
Editor of portion(s)	Colin McGuckin, Marcin Jurga, Hamad Ali, Marko Strbad & Nicolas Forraz
Author of portion(s)	Colin McGuckin, Marcin Jurga, Hamad Ali, Marko Strbad & Nicolas Forraz
Volume of serial or monograph	3
Issue, if republishing an article from a serial	6
Page range of portion	1046-55
Publication date of portion	2008/06/10
Rights for	Main product
Duration of use	Life of current edition
Creation of copies for the disabled	no
With minor editing privileges	no
For distribution to	Worldwide
In the following language(s)	Original language of publication
With incidental promotional use	no
Lifetime unit quantity of new product	Up to 499
Made available in the following markets	education
The requesting person/organization	Kathrin Becker
Order reference number	
Author/Editor	Kathrin Becker
The standard identifier of New Work	Kathrin Becker
The proposed price	0
Title of New Work	NK-Zell-vermittelte Dedifferenzierung von Brustkrebszellen als neuer Resistenzmechanismus
Publisher of New Work	Universitätsfrauenklinik Würzburg
Expected publication date	Jan 2018
Estimated size (pages)	96

## 9 Literaturverzeichnis

1. Weyerstahl T., S.M., *Gynäkologie und Geburtshilfe*. Duale Reihe. Vol. 4. Vollständig überarbeitete Auflage 2013: Thieme.
2. DeSantis, C.E., et al., *Cancer treatment and survivorship statistics, 2014*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(4): p. 252-71.
3. Tinoco, G., et al., *Treating breast cancer in the 21st century: emerging biological therapies*. J Cancer, 2013. **4**(2): p. 117-32.
4. Bedognetti, D., et al., *Checkpoint Inhibitors and Their Application in Breast Cancer*. Breast Care (Basel), 2016. **11**(2): p. 108-15.
5. Mehta, R.S., et al., *Combination anastrozole and fulvestrant in metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **367**(5): p. 435-44.
6. Dick, J.E., *Breast cancer stem cells revealed*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3547-9.
7. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
8. Bonnet, D. and J.E. Dick, *Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell*. Nat Med, 1997. **3**(7): p. 730-7.
9. Cho, R.W. and M.F. Clarke, *Recent advances in cancer stem cells*. Curr Opin Genet Dev, 2008. **18**(1): p. 48-53.
10. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3983-8.
11. Fillmore, C.M. and C. Kuperwasser, *Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy*. Breast Cancer Res, 2008. **10**(2): p. R25.
12. Battula, V.L., et al., *Ganglioside GD2 identifies breast cancer stem cells and promotes tumorigenesis*. J Clin Invest, 2012. **122**(6): p. 2066-78.
13. Mani, S.A., et al., *The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells*. Cell, 2008. **133**(4): p. 704-15.
14. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(2): p. 131-42.
15. Yu, M., et al., *Circulating breast tumor cells exhibit dynamic changes in epithelial and mesenchymal composition*. Science, 2013. **339**(6119): p. 580-4.
16. Santisteban, M., et al., *Immune-induced epithelial to mesenchymal transition in vivo generates breast cancer stem cells*. Cancer Res, 2009. **69**(7): p. 2887-95.
17. Economopoulou, P., V.G. Kaklamani, and K. Siziopikou, *The role of cancer stem cells in breast cancer initiation and progression: potential cancer stem cell-directed therapies*. Oncologist, 2012. **17**(11): p. 1394-401.
18. Korkaya, H., S. Liu, and M.S. Wicha, *Breast cancer stem cells, cytokine networks, and the tumor microenvironment*. J Clin Invest, 2011. **121**(10): p. 3804-9.
19. Tanei, T., et al., *Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(12): p. 4234-41.
20. Kabos, P., et al., *Cytokeratin 5 positive cells represent a steroid receptor negative and therapy resistant subpopulation in luminal breast cancers*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **128**(1): p. 45-55.

21. Reim, F., et al., *Immunoselection of breast and ovarian cancer cells with trastuzumab and natural killer cells: selective escape of CD44<sup>high</sup>/CD24<sup>low</sup>/HER2<sup>low</sup> breast cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2009. **69**(20): p. 8058-66.
22. Dvorak, H.F., *Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing*. *N Engl J Med*, 1986. **315**(26): p. 1650-9.
23. Mamessier, E., et al., *Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition*. *Cancer Res*, 2011. **71**(21): p. 6621-32.
24. Kärre, K., et al., *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*. *Nature*, 1986. **319**(6055): p. 675-8.
25. Chalupny, N.J., et al., *ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003. **305**(1): p. 129-35.
26. Steigerwald, J., *Der NK-Zellrezeptor NKG2D als Zielstruktur für eine Antikörperbasierte therapeutische Immunmodulation 2008*.
27. Gonzalez, S., V. Groh, and T. Spies, *Immunobiology of human NKG2D and its ligands*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **298**: p. 121-38.
28. Terunuma, H., et al., *Potential role of NK cells in the induction of immune responses: implications for NK cell-based immunotherapy for cancers and viral infections*. *Int Rev Immunol*, 2008. **27**(3): p. 93-110.
29. Tallero, R., et al., *NK cells control breast cancer and related cancer stem cell hematological spread*. *Oncoimmunology*, 2017. **6**(3): p. e1284718.
30. Dunn, G.P., et al., *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(11): p. 991-8.
31. Knutson, K.L., et al., *Immunoediting of cancers may lead to epithelial to mesenchymal transition*. *J Immunol*, 2006. **177**(3): p. 1526-33.
32. Wang, B., et al., *Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancer stem cells*. *Cancer Res*, 2014. **74**(20): p. 5746-57.
33. de Kruijf, E.M., et al., *NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 24.
34. Akalay, I., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis*. *Cancer Res*, 2013. **73**(8): p. 2418-27.
35. Mamessier, E., C. Bourgin, and D. Olive, *When breast cancer cells start to fend the educational process of NK cells off*. *Oncoimmunology*, 2013. **2**(12): p. e26688.
36. Delfortrie, S., et al., *Egfl7 promotes tumor escape from immunity by repressing endothelial cell activation*. *Cancer Res*, 2011. **71**(23): p. 7176-86.
37. Ricciardi, M., et al., *Epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) induced by inflammatory priming elicits mesenchymal stromal cell-like immune-modulatory properties in cancer cells*. *Br J Cancer*, 2015.
38. Mamessier, E., et al., *Peripheral blood NK cells from breast cancer patients are tumor-induced composite subsets*. *J Immunol*, 2013. **190**(5): p. 2424-36.
39. Tonge, P.D., et al., *Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states*. *Nature*, 2014. **516**(7530): p. 192-7.



40. McGuckin, C., et al., *Culture of embryonic-like stem cells from human umbilical cord blood and onward differentiation to neural cells in vitro*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1046-55.
41. Jing, H., et al., *Suppression of Spry4 enhances cancer stem cell properties of human MDA-MB-231 breast carcinoma cells*. Cancer Cell Int, 2016. **16**: p. 19.
42. Madjd, Z., et al., *Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer*. Int J Cancer, 2005. **117**(2): p. 248-55.
43. Cai, X., et al., *Autonomous stimulation of cancer cell plasticity by the human NKG2D lymphocyte receptor coexpressed with its ligands on cancer cells*. PLoS One, 2014. **9**(10): p. e108942.
44. Wiemann, K., et al., *Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 720-9.
45. Diessner, J., et al., *Targeting breast cancer stem cells with HER2-specific antibodies and natural killer cells*. Am J Cancer Res, 2013. **3**(2): p. 211-20.
46. Diessner, J., et al., *Targeting of preexisting and induced breast cancer stem cells with trastuzumab and trastuzumab emtansine (T-DM1)*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1149.
47. Singh, A. and J. Settleman, *EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer*. Oncogene, 2010. **29**(34): p. 4741-51.
48. Spear, P., et al., *NKG2D ligands as therapeutic targets*. Cancer Immun, 2013. **13**: p. 8.
49. Raab, S., et al., *Fc-optimized NKG2D-Fc constructs induce NK cell antibody-dependent cellular cytotoxicity against breast cancer cells independently of HER2/neu expression status*. J Immunol, 2014. **193**(8): p. 4261-72.



## **10 Danksagung**

Folgenden Personen möchte ich meinen herzlichsten Dank aussprechen, da sie maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jörg Wischhusen für die erstklassige Planung und Betreuung des gesamten Projektes. Durch seine ständige Hilfsbereitschaft, viel Geduld und seine große Fachkompetenz, die sich vor allem dann zeigte, wenn Probleme auftraten, hat er diese Arbeit erst ermöglicht.

Vielen Dank auch an Universitäts-Professor Dr. med. Achim Wöckel, Direktor der Frauenklinik und Poliklinik der Universität Würzburg, für die Möglichkeit meine medizinische Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Weiterhin bedanken möchte ich mich bei Dr. Joachim Diessner, Dr. Markus Junker und Dr. Anoop Chandran für ihre konstruktiven Ratschläge, methodischen Tipps und ihre wissenschaftliche Diskussionsbereitschaft.

Ich danke Evi Horn und Monika Ossadnik für ihre Erfahrung und Hilfsbereitschaft, die mir den Einstieg in die Laborarbeit erleichtert haben.

Der gesamten „Sektion für experimentelle Tumorummunologie“ der Universitätsfrauenklinik Würzburg sage ich Danke für die angenehme Atmosphäre und die interessante Zeit im Labor.

In besonderem Maße dankbar bin ich meinem Ehemann, Daniel Becker, für die unermüdliche Stärkung und Motivierung, sowie die familiäre Unterstützung während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation. Danke auch an Elisabeth, Katharina und Josephine für die Geduld mit ihrer Mutter.

Mein größter Dank gilt nicht zuletzt meinen Eltern, Dr. Michael Berkel und Anke Berkel, die mich in der gesamten Schul- und Studienzeit mit höchstem Engagement finanziell und moralisch unterstützt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie möglich gewesen.

