

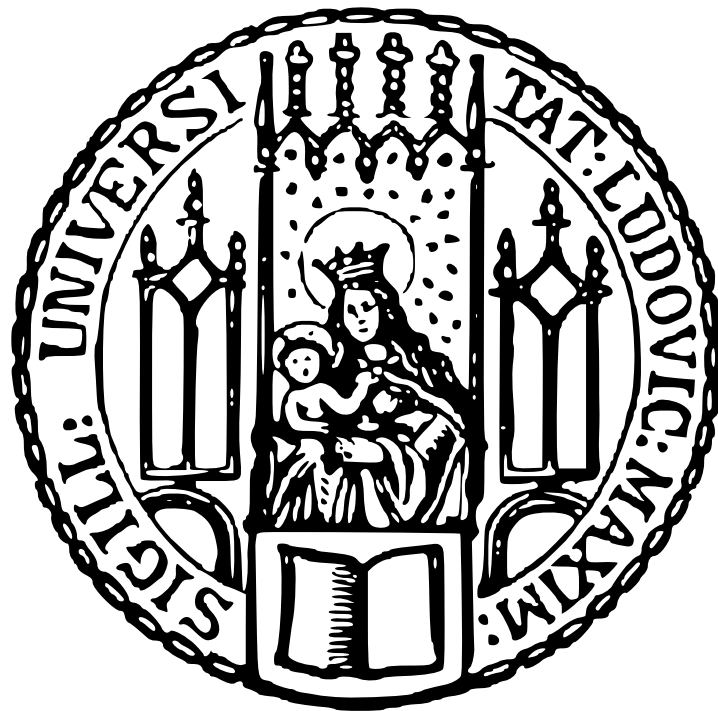
# DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

## **Bedeutung der Gewebe-Azidose für die Funktion intratumoraler NK-Zellen**

David Andreas Roser

aus  
Ried im Innkreis



2020

Aus der Eigenständigen Forschungseinheit Translationale Molekulare Immunologie  
Helmholtz-Zentrum München  
Leitung: Prof. Dr. Ralph Mocikat

# **Bedeutung der Gewebe-Azidose für die Funktion intratumoraler NK-Zellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
David Andreas Roser  
aus  
Ried im Innkreis

2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Mocikat

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P.A. Baeuerle  
Priv. Doz. Dr. R. Kammerer

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. N. Deppisch

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10.2020

# EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

---

Hiermit versichere ich an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation

*„Bedeutung der Gewebe-Azidose für die  
Funktion intratumoraler NK-Zellen“*

selbstständig angefertigt habe, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Augsburg, 23.10.2020

David Andreas Roser

---

(Ort, Datum)

(Doktorand)

# AUTORENSCHAFT

---

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit sind in eine wissenschaftliche Publikation mit dem Titel

*„Reversal of tumor acidosis by systemic buffering reactivates NK cells to express IFN- $\gamma$  and induces NK cell-dependent lymphoma control without other immunotherapies.“*

im

**International Journal of Cancer**

eingeflossen und werden fortan unter „(Pötzl *et al.*, 2017)“ ausgewiesen.

*"Wer nach den Sternen reisen will, der sehe sich nicht  
nach Gesellschaft um."*

***Friedrich Hebbel***

# ZUSAMMENFASSUNG

---

Die Laktatazidose ist ein Mechanismus der Immunsuppression im Tumormikromilieu und ein klassisches Kennzeichen maligner Transformation. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass sie jedoch durch vergleichsweise simple Methoden, wie nebenwirkungsarme Medikamente oder systemische Puffer, neutralisiert werden kann.

Ziel der Arbeit war es, die Auswirkungen der Laktatazidose und ihrer Neutralisierung anhand von oraler Natriumbikarbonatgabe auf die Funktion natürlicher Killerzellen (NKZ) zu untersuchen und die verantwortlichen Mechanismen aufzuzeigen.

Zu diesem Zweck wurde ein transgenes Spontanlymphommodell der Maus verwendet, das klinisch dem humanen Burkitt-Lymphom, einem aggressiven B-Zell-Lymphom aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome entspricht. Es war bereits bekannt, dass das mittlere Überleben erkrankter Mäuse durch orale Applikation von Natriumbikarbonat signifikant verlängert wird. Dieser Effekt konnte anhand eines Depletionsversuches eindeutig auf NKZ zurückgeführt werden. Es zeigte sich, dass NKZ unter Therapie in Tumoren stärker akkumulieren und der zugrunde liegende Mechanismus möglicherweise die CXCR3-vermittelte Chemotaxis darstellt. Darüber hinaus konnte für das hier verwendete c-MYC-Lymphom bereits gezeigt werden, dass intratumorale NKZ progredient ihre Funktion verlieren und in einen Zustand funktioneller Anergie eintreten. Die NKZ-Funktion sollte daher unter Therapie überprüft werden. Obwohl die Therapie zu einer signifikant höheren Interferon-(IFN)- $\gamma$ -Expression führte, konnte anhand von Zytotoxizitätsversuchen und der Analyse der Synthese zytolytischer Enzyme keine eindeutige Verbesserung der Zytotoxizität nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der verantwortlichen Signalmoleküle ergab sich jedoch eine gesteigerte Aktivierung sowohl des *ERK*-, als auch des *JNK*-Signalweges. *ERK*, das sowohl Degranulation als auch die Zytokinexpression (IFN- $\gamma$ ) natürlicher Killerzellen reguliert, scheint alleine nicht ausreichend zu sein, die effektive Lysekapazität zu steigern. Es könnte jedoch - zusammen mit *JNK*, welches ausschließlich die Zytokinexpression reguliert - eine Erklärung für die unter Therapie signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Expression bieten. Ähnliche Effekte konnten auch in T-Zellen beobachtet werden - hierfür bedarf es

jedoch weiterer Untersuchungen. Des Weiteren wies die Analyse von ex vivo entnommenen Seren unter Therapie auf eine effektive Antitumorantwort hin.

Zudem wurde gezeigt, dass die Therapie auch im transplantierbaren Lymphom-Modell und unter adoptivem NKZ-Transfer antitumorale Effekte zur Folge hat. Hierfür wurden Donor-NKZ aus Wildtyp-Mäusen entnommen, markiert und anschließend adoptiv in subkutane Tumoren unbehandelter sowie behandelter Mäuse transferiert. 24h später zeigte die Analyse von behandelten Empfängertieren sowohl in transferierten als auch endogenen NKZ eine höhere Expression des - für eine effektive Antitumorantwort essenziellen - Immunmediators IFN- $\gamma$ .

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der immunsuppressiven Effekte der Laktatazidose auf die Funktion natürlicher Killerzellen in soliden Tumoren und bietet Ausblick auf künftige, klinisch anwendbare Interventionen zur Neutralisierung der tumorinduzierten Laktatazidose.



# INHALTSVERZEICHNIS

---

|  |    |
|--|----|
| EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG .....             | I  |
| AUTORENSCHAFT .....                            | II |
| ZUSAMMENFASSUNG.....                           | IV |
| INHALTSVERZEICHNIS .....                       | VI |
| 1 EINLEITUNG .....                             | 1  |
| 1.1 Das Immunsystem.....                       | 1  |
| 1.1.1 Das angeborene Immunsystem .....         | 1  |
| 1.1.1.1 Natürliche Killerzellen.....           | 2  |
| 1.1.2 Das adaptive Immunsystem .....           | 4  |
| 1.2 Immunkontrolle von Tumoren.....            | 6  |
| 1.2.1 Immuneditionierung .....                 | 6  |
| 1.3 Das Tumormikromilieu .....                 | 6  |
| 1.3.1 NK-Zellen im Tumormikromilieu .....      | 6  |
| 1.3.2 Laktatazidose.....                       | 8  |
| 1.3.3 Effekte der Laktatazidose .....          | 9  |
| 1.4 Zielsetzung .....                          | 12 |
| 2 MATERIAL UND METHODEN.....                   | 14 |
| 2.1 Materialien.....                           | 14 |
| 2.1.1 Geräte und Verbrauchsgegenstände .....   | 14 |
| 2.1.2 Reagenzien und Chemikalien .....         | 15 |
| 2.1.3 Medien und Puffer .....                  | 17 |
| 2.1.4 Antikörper .....                         | 18 |
| 2.1.4.1 Fluoreszenz-markierte Antikörper ..... | 18 |
| 2.1.4.2 Depletions-Antikörper .....            | 20 |
| 2.1.5 Kits.....                                | 20 |
| 2.1.6 Mäuse.....                               | 21 |
| 2.1.7 Software .....                           | 21 |
| 2.2 Methoden .....                             | 22 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.2.1 Zelllinien und -kultur .....  | 22        |
| 2.2.2 Behandlung mit NaHCO <sub>3</sub> .....   | 22        |
| 2.2.3 Organentnahme und Aufarbeitung.....   | 22        |
| 2.2.4 NK-Zell-Depletion .....   | 23        |
| 2.2.5 NK-Zell-Isolierung .....  | 24        |
| 2.2.6 Durchflusszytometrie .....  | 25        |
| 2.2.7 Zytotoxizität: CD107a-Messung .....   | 26        |
| 2.2.8 Zytotoxizität: Chrom-[51]-Freisetzung.....  | 27        |
| 2.2.9 Messung von phosphorylierten Proteinen.....                                       | 28        |
| 2.2.10 Färbung mit Proliferation Dye / CFDA-SE / CFSE .....                             | 28        |
| 2.2.11 Adoptiver NK-Zell-Transfer .....   | 29        |
| 2.2.12 Zytokin-Analyse .....  | 30        |
| 2.2.13 Statistik.....   | 30        |
| <b>3 ERGEBNISSE .....</b>   | <b>31</b> |
| 3.1 Intratumorale NK-Zellzahl.....  | 32        |
| 3.1.1 Natriumbikarbonat führt zu erhöhter NK-Zellzahl in Milzen .....                   | 32        |
| 3.1.2 NK-Zellzahl in Lymphknoten unverändert .....                                      | 32        |
| 3.2 Intratumorale NKZ-Proliferation ist therapieunabhängig .....                        | 33        |
| 3.3 Intratumorale NKZ-Migration .....   | 34        |
| 3.3.1 Therapie führt in Milzen zur Internalisierung von CXCR3.....                      | 34        |
| 3.3.2 CXCR3-Expression in Lymphknoten ist nicht therapieabhängig .....                  | 34        |
| 3.4 Therapievermitteltes Überleben ist NKZ-abhängig .....                               | 35        |
| 3.5 NKZ-vermittelte Zytotoxizität .....   | 37        |
| 3.5.1 Expression zytolytischer Peptide in NKZ .....                                     | 37        |
| 3.5.2 Degranulation intratumoraler NKZ ist nicht therapieabhängig .....                 | 38        |
| 3.5.3 In-vitro Zytotoxizität intratumoraler NKZ ist nicht therapieabhängig .....        | 39        |
| 3.6 Molekulare Mechanismen des Funktionsverlustes .....                                 | 40        |
| 3.6.1 MAPK-Expression in NKZ .....  | 41        |
| 3.6.1.1 NaHCO <sub>3</sub> stimuliert den pERK-Signalweg in NKZ .....                   | 41        |
| 3.6.1.2 NaHCO <sub>3</sub> stimuliert den pJNK-Signalweg in NKZ .....                   | 41        |
| 3.6.1.3 Der pp38-Signalweg in NKZ wird durch NaHCO <sub>3</sub> nicht beeinflusst ..... | 42        |
| 3.6.2 MAPK-Expression in T-Zellen.....  | 43        |

|  |        |
|--|--------|
| 3.6.2.1 pERK in T-Zellen .....   | 44     |
| 3.6.2.2 pJNK in T-Zellen .....   | 44     |
| 3.6.2.3 pp38 in T-Zellen .....   | 44     |
| 3.7 IFN- $\gamma$ -Expression unter adoptivem NKZ-Transfer therapieabhängig erhöht.....                                    | 45     |
| 3.8 Zytokinmilieu: Therapie führt zu Th1-Differenzierung .....   | 47     |
| 4 DISKUSSION .....   | 49     |
| 4.1 Orale Bikarbonatgabe verstärkt NKZ-Migration und führt zu effektiver<br>Antitumorantwort.....                          | 50     |
| 4.1.1 200 mM NaHCO <sub>3</sub> p.o. führt zu NKZ-abhängigem Überlebensvorteil im<br>endogenen $\lambda$ -Myc-Modell ..... | 50     |
| 4.1.2 NK-Zellen migrieren chemotaktisch in endogene Tumoren .....  | 51     |
| 4.2 Mechanismen der gesteigerten Effektorfunktion intratumoraler NKZ.....  | 52     |
| 4.2.1 Unveränderte Zytotoxizität trotz Steigerung des zytotoxischen Potenzials..   | 52     |
| 4.2.2 Mediatoren der pH-vermittelten Funktionssteigerung: ERK und JNK.....   | 54     |
| 4.3 Kompensation der Tumorazidose als Supportivum adoptiver NKZ-Transfers .....  | 56     |
| 4.4 NKZ induzieren Th1-Differenzierung .....   | 57     |
| 4.5 Klinisch-therapeutische Anwendung .....  | 58     |
| 4.6 Ausblick .....   | 59     |
| LITERATURVERZEICHNIS .....   | - 1 -  |
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....  | - 12 - |
| DANKSAGUNG .....   | - 15 - |

# 1 EINLEITUNG

---

## 1.1 Das Immunsystem

Die ersten Berichte über die Entdeckung der Immunität führen bis 3000 Jahre zurück nach China, als durch intranasale Variolation eine Art Pockenimpfung etabliert wurde. Auch in Indien und dem osmanischen Reich finden sich über die Jahrhunderte Hinweise auf Impfversuche. Der Beginn der modernen Immunologie ist umstritten - nach heutigem Stand ist er jedoch am ehesten mit Paul Ehrlich um 1900 anzusiedeln.

Der Informationsgewinn im Bereich der Immunologie ist seitdem enorm. Das Immunsystem ist einer der essenziellen Mechanismen, die dafür sorgen, dass wir der ständigen Konfrontation mit pathogenen Erregern, fremdem Material und alterierten, körpereigenen Zellen gewappnet sind. Die immunologische Antwort folgt vier Prinzipien:

1. **Immunologische Erkennung:** Ein Erreger oder Fremdkörper muss zunächst als solcher erkannt werden, um eine Reaktion nach sich zu ziehen.
2. **Immunologische Abwehr:** Es kommt zur Aktivierung und Einwanderung von Leukozyten - man spricht von der Entzündungsreaktion.
3. **Immunregulation:** Eine überschießende Immunantwort muss kontrolliert werden, um eine Entstehung von Allergien und Autoimmunerkrankungen zu verhindern.
4. **Immunologisches Gedächtnis:** Nach erfolgter Immunantwort des adaptiven Immunsystems kommt es bei erneuter Infektion zu einer früheren und stärkeren Reaktion auf das Pathogen.

Das Immunsystem wird in das *angeborene* sowie das *erworbene* bzw. *adaptive Immunsystem* untergliedert. Die Grenzen sind jedoch aufgrund vieler Schnittstellen und Interaktionen der beiden Systeme fließend.

### 1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist der phylogenetisch ältere Teil der Immunität. Es besteht einerseits aus physikalischen und chemischen Barrieren wie Haut und

Schleimhaut, andererseits aus zellulären Komponenten wie den Makrophagen, Granulozyten (neutrophile, eosinophile und basophile), dendritischen Zellen (DZ) und natürlichen Killerzellen (NKZ). Überwindet ein pathogener Erreger Haut und Schleimhaut, wird er innerhalb von Minuten von Makrophagen - dem ältesten Element des angeborenen Immunsystems - erkannt und phagozytiert. Dies erfolgt mithilfe Keimbahn-kodierter Rezeptoren, den sogenannten *Pattern Recognition Receptors* (PRR), wie den Mannose-, *Scavenger*- oder *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR). Diese werden auf Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert und erkennen sogenannte *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (PAMP's) - konservierte Strukturen der mikrobiellen Evolution, wie Lipopolysaccharide (LPS), Proteoglykane und nichtmethylierte CpG-DNA. Eine Aktivierung der Makrophagen führt durch Sekretion verschiedener Zytokine (Prostaglandine, Interleukine, Tumornekrosefaktor (TNF)) und Chemokine zur klassischen Entzündungsreaktion: Vasodilatation, Diapedese und Infiltration verschiedener Leukozytenfraktionen (v.a. neutrophiler Granulozyten). Zudem nehmen unreife dendritische Zellen Partikel des fremden Antigens auf, wandern mithilfe der Lymphe in die sekundären lymphatischen Organe (Milz, Lymphknoten und lymphatisches Gewebe), wo sie zu reifen antigenpräsentierenden Zellen (APZ) differenzieren und das adaptive Immunsystem aktivieren (Siehe „*Das adaptive Immunsystem*“). Das humorale Element des angeborenen Immunsystems stellt, neben den  $\alpha$ -/β-Defensinen der Schleimhaut, das Komplementsystem dar. Dies sind Plasmaproteine, die entweder antikörperabhängig (*klassischer Weg*) oder direkt (*alternativer Weg*) durch Reaktion mit pathogenen Oberflächenmolekülen proteolytische Kaskaden entfachen und die Zelle vollständig mit Komplementpartikeln bedecken. Dieser Mechanismus kann den Erreger entweder selbstständig zerstören (*Membran-Angriffskomplex*) oder durch weitere Markierung des Erregers Makrophagen, NKZ sowie zytotoxischen T-Zellen (CTL, *Cytotoxic T-Lymphocytes*) als Zielmarkierung dienen.

### **1.1.1.1 Natürliche Killerzellen**

NK-Zellen wurden ursprünglich als Nicht-B-Nicht-T-Lymphozyten des angeborenen Immunsystems beschrieben, die in der Lage sind, Tumorzellen in vitro ohne vorherige Sensibilisierung zu zerstören (Kiessling *et al.*, 1975). Sie werden durch Interleukin-(IL)-12

und IFN- $\alpha$ / $\beta$  in der frühen Phase der Immunabwehr aktiviert und können Zellen abtöten, die intrazelluläre Erreger (z.B. Viren, Leishmanien) in sich tragen oder einer malignen Transformation erliegen, bis diese Funktion durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des adaptiven Immunsystems übernommen wird. Dazu tragen sie ein großes Repertoire invarianter Rezeptoren, die ihre Aktivität über eine Balance aus aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren regulieren. Dies sind in Mäusen vor allem die auf dem NK-Rezeptor-Komplex (NKC) kodierten Killerzellen-lektinähnlichen Rezeptoren (KLR) der C-Typ-Lektin-Familie. Zum einen bilden dabei CD94 und Proteine der NKG2-Familie ein Heterodimer, das entweder aktivierend (z.B. NKG2C), inhibierend (z.B. NKG2A/B) oder - je nach *Splicing* – als Homodimer beides (z.B. NKG2D) sein kann. Es gibt jedoch auch weitere Rezeptoren, die eine zellregulierende Funktion vermitteln (z.B. Ly49). Viele dieser Rezeptoren binden MHC-Klasse-I-Moleküle (z.B. Qa1 in der Maus) und regulieren in Abhängigkeit der Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf anderen Zellen die Aktivität von NKZ. MHC-Klasse-I-Moleküle - sozusagen die „Ausweise der Zelle“ - werden von allen Zellen des Körpers exprimiert und liefern durch Prozessierung und Präsentation intrazellulärer Peptide einen „Überblick“ über den Haushalt der Zelle. Durch manche Viren oder im Rahmen einer malignen Transformation kommt es zur verringerten Expression dieser Moleküle; folglich können keine Antigene präsentiert werden, und die Zelle entzieht sich der Zytotoxizität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. Alternativ kommt es zur gesteigerten Expression von Signalmolekülen, die auf metabolischen Stress oder eine Infektion hinweisen. NKZ können gesunde Zellen dann durch Sekretion von IFN- $\gamma$  zur Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen „zwingen“; virusinfizierte Zellen können auf diese Stimulation nicht adäquat reagieren und werden daraufhin als fremd erkannt und abgetötet. Zudem verfügen NKZ über eine Reihe MHC-Klasse-I-unabhängiger, immunglobulinähnlicher Rezeptoren, die sogenannten aktivierenden Natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (NCR), wie NKp30, NKp44 und NKp46; aber auch DNAM-1 und das o.g. NKG2D können MHC-I-unabhängig aktiviert werden. Hat bereits eine adaptive Immunantwort mit Immunglobulinbildung zur Markierung von Zielzellen geführt, können diese mittels Fc $\gamma$ -Rezeptor III (CD16) auf NKZ gebunden werden und aktivieren dabei die sogenannte Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*; ADCC).

Kommt es durch einen dieser Signalwege zur Aktivierung der NK-Zelle, stehen im

Wesentlichen drei Mechanismen zur Verfügung, um die Zielzelle in die Apoptose zu treiben. Dies ist zum einen die „klassische“ Granzym-Perforin-Kaskade, bei welcher die in intrazellulären Granula gespeicherte Serin-Proteasen (Granzym A, B) über das porenbildende Perforin (*Prf*) in die Zielzelle gelangen, um spezifische proapoptotische Caspasen zu spalten und damit zu aktivieren; zum anderen der Todesrezeptor-Weg über den Fas-Ligand (FasL), *TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand* (TRAIL/Apo2L) und das Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ). In der Tumorkontrolle scheinen vor allem Perforin sowie Granzym B (*Grz B*) von entscheidender Bedeutung zu sein (van den Broek *et al.*, 1995; 1996; Smyth *et al.*, 2000). Außerdem können NKZ durch Interaktion mit dendritischen Zellen IL-12- und TNF-vermittelt zur Produktion des zentralen Immunmediators IFN- $\gamma$  angeregt werden. IFN- $\gamma$  spielt eine essenzielle Rolle in der Erhaltung der Immunreaktion und fördert die Differenzierung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zu T-Helfer-Typ-1-(Th1)-Zellen (siehe „Das adaptive Immunsystem“).

### 1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Ogleich entwicklungsgeschichtlich jünger, hat sich das adaptive Immunsystem im Laufe der Evolution zu einer hochspezialisierten Maschinerie entwickelt, die in der Lage ist, praktisch jedes denkbare pathogene Molekül im Rahmen der Immunantwort zu erkennen. Die Kernelemente des adaptiven Immunsystems bilden B- und T-Lymphozyten. Wie alle hämatopoetischen Zellen werden sie im Knochenmark gebildet, jedoch reifen nur B-Zellen dort auch heran; T-Zellen wandern in den Thymus und unterliegen einem komplexen Reifungsprozess, der gewährleistet, dass körpereigene Moleküle nicht angegriffen werden, d.h. „fremd“ von „selbst“ mit höchster Präzision unterschieden werden kann. Sie reifen dabei von „doppelt-negativen“ über „doppelt-positiven“ hin zu „einfach positiven“ CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und verlassen daraufhin den Thymus. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen differenzieren anschließend weiter zu sogenannten T-Helfer-Zellen, den Th1- oder Th2-Zellen, regulatorischen T-Zellen (Tregs) oder Th17-Zellen. Zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen können über ähnliche Mechanismen wie NKZ des angeborenen Immunsystems Apoptose in Zielzellen auslösen.

Naive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen werden aktiviert, indem ein von APZ (DZ, B-Zellen, Makrophagen) dargebotenes pathogenes Molekül auf MHC-Klasse-II-Molekülen vom dafür bestimmten T-Zell-Rezeptor (TZR) gebunden wird. Jede T-Zelle trägt einen einzigartigen TZR; diese

Vielfalt wird durch somatische Rekombination der V-, D- und J-Gensegmente erreicht und ermöglicht, mit etwa einer Milliarde Lymphozyten eine schier unvorstellbare Menge an Molekülen zu erkennen. Um eine fehlerhafte Aktivierung der T-Zellen zu vermeiden, werden jedoch zusätzliche Signale benötigt: zum einen die oben genannten Korezeptoren CD4 (für MHC-II) und CD8 (für MHC-I), zum anderen sogenannte kostimulatorische Signale wie das aktivierende CD28 und das antagonistisch wirkende CTLA-4 (für CD80/86 bzw. B7-1/2 auf APZ). Ohne entsprechende Kostimulation kommt es zur funktionellen Anergie der T-Zellen. Die Aktivierung eines Lymphozyten lässt diesen zu einem Lymphblasten heranreifen, der durch klonale Expansion bis zu 1.000 Tochterzellen hervorbringt. Diese Vermehrung benötigt jedoch Zeit, weshalb die adaptive Immunantwort erst mit einer Verzögerung von vier bis fünf Tagen effektiv wird. Die daraus entstandenen Effektor-T-Zellen wandern einerseits direkt an den Infektionsherd, andererseits verbleiben sie im Lymphknoten und aktivieren als „Helfer-Zellen“ ruhende B-Zellen, woraufhin sich diese zu reifen, antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. Aktive Plasmazellen migrieren zurück in das Knochenmark und geben ihre Antikörper - den humoralen Anteil des adaptiven Immunsystems - ins Blut ab. Nach überstandener Infektion reifen die überlebenden Lymphozyten zu sogenannten Gedächtniszellen heran, und können bei erneuter Infektion mit demselben Pathogen durch Affinitätsreifung der Antikörper eine erheblich schnellere und stärkere Immunantwort induzieren (Immunität). Die Differenzierung naiver T-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen hängt vom vorherrschenden Zytokinmilieu ab. So führen etwa IFN- $\gamma$ , IL-12 (v.a. von NKZ und DZs) zu einer Th1-Differenzierung. Dies wiederum veranlasst Th1-Zellen, durch Sekretion von IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF nun zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, Makrophagen und in geringerem Maße B-Zellen zu aktivieren. IL-4, IL-6 und IL-10 hingegen leiten eine Th2-Differenzierung ein und führen damit durch IL-4, IL-5 und IL-13 vorrangig zur Aktivierung von B-Zellen. Für eine effektive Tumorantwort wird eine Th1-Differenzierung als vorteilhaft angesehen (Egeter *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2009; Braumüller *et al.*, 2013).



## 1.2 Immunkontrolle von Tumoren

### 1.2.1 Immuneditierung

Bereits 1957 formulierten Macfarlane Burnet und Lewis Thomas die These der Immunüberwachung („*Immunosurveillance*“), die dem Immunsystem eine tragende Rolle in der Kontrolle und Bekämpfung von Tumoren zukommen lässt (Burnet, 1957, 1964, 1970). Diese These wurde 2007 von Dunn *et al.* durch das Konzept der Immuneditierung ersetzt („*Immunoediting*“; Dunn *et al.*, 2007). Dabei werden im Wesentlichen 3 Phasen der Immunkontrolle von Tumoren beschrieben: Elimination, Äquilibrium und Evasion.

Die erste Phase resultiert - wenn erfolgreich - in einer kompletten Elimination der malignen Zellen. Sie ist geprägt von der Infiltration und Erkennung des Tumors durch NK-, NKT-,  $\gamma\delta$ -T-Zellen, Makrophagen und DZs, die eine massive Sekretion von IFN- $\gamma$  nach sich zieht. Diese bewirkt 1) eine Ausschüttung der Chemokine CXCL-9/-10 und -11, 2) die Infiltration weiterer NKZ und Makrophagen (die sich gegenseitig durch IL-12 und IFN- $\gamma$  potenzieren) und hat 3) direkte proapoptotische Antitumorfunktion. Die dabei entstehenden Tumorlyseprodukte werden von DZs aufgenommen, in regionale Lymphknoten transportiert und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert, die wiederum als Th1-Zellen zu einer tumorspezifischen, zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort führen. In der zweiten Phase herrscht ein konstanter Selektionsdruck durch aktive Lymphozyten und IFN- $\gamma$ , wobei es durch Mutationen zu einer Selektion immunresilienter Tumorzellen kommt. Die Kontrahenten halten sich über Jahre hinweg gegenseitig in Schach („Äquilibrium“). Die dritte Phase bedeutet die unkontrollierte Expansion maligner Zellen - der Tumor „entkommt“ dem Immunsystem.

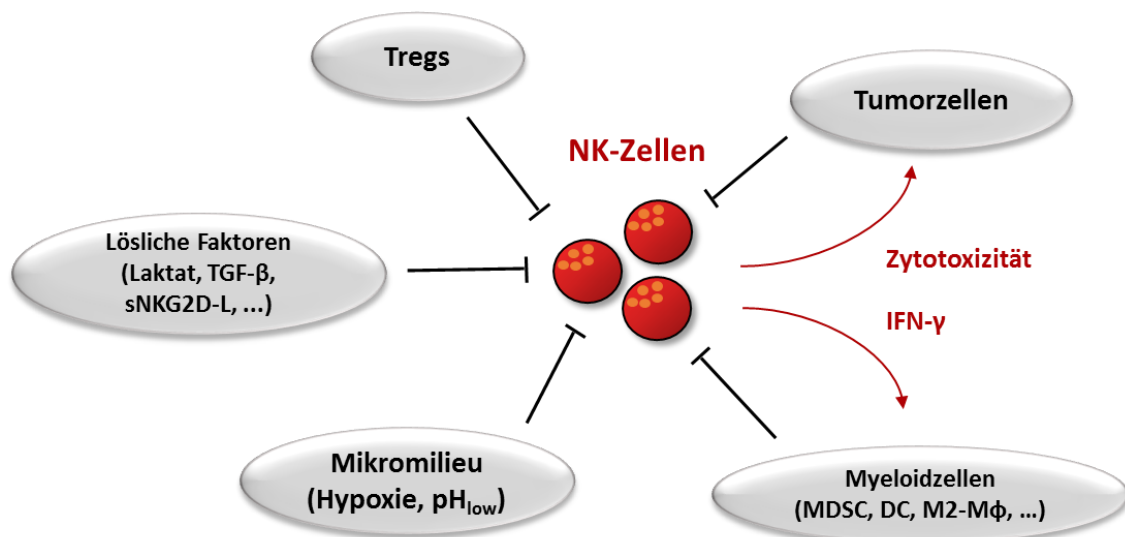
## 1.3 Das Tumormikromilieu

### 1.3.1 NK-Zellen im Tumormikromilieu

Wie aus oben beschriebenem Ablauf erkenntlich, kommt NKZ in der Immuneditierung eine zentrale Rolle zu. Das Tumormikromilieu wartet jedoch mit einer ganzen Reihe an Faktoren auf, die eine wirkungsvolle Funktion dieser verhindert. Dies sind zum einen immunsuppressive Immunzellen wie Tregs (v.a. durch TGF- $\beta$ ), *Myeloid-Derived Suppressor Cells* (MDSCs), M2-polarisierte, tumorassoziierte Makrophagen (TAMs, M2-

MΦ) oder unreife DZs (iDCs; *immature Dendritic Cells*), andererseits lösliche Faktoren wie TGF- $\beta$ , IL-18, lösliche NKG2D-Liganden (sNKG2D-L), Prostaglandin E2 (PGE2), Laktat,IDO (Indolamin-2-3-Dioxygenase) und ihr Produkt Kynurenin, sowie chemische Faktoren wie ein niedriger pH-Wert (pH<sub>low</sub>) oder hypoxischer Stress (Groh *et al.*, 2002; Della Chiesa *et al.*, 2006; Smyth *et al.*, 2006; Ghiringhelli *et al.*, 2006; Denko, 2008; Nagaraj and Gabrilovich, 2008; Gabrilovich and Nagaraj, 2009; Li *et al.*, 2009; Terme *et al.*, 2011; Godin-Ethier *et al.*, 2011; O'Sullivan *et al.*, 2012; Hurwitz and Watkins, 2012; Kim *et al.*, 2012; Vivar *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2015).

In frühen Stadien sind NKZ jedoch in der Lage, iDCs und MDSCs zu eliminieren (Nausch *et al.*, 2008; Wehner *et al.*, 2011) und damit eine Toleranzinduktion zu verhindern (**Abb. 1**; Hurwitz and Watkins, 2012).



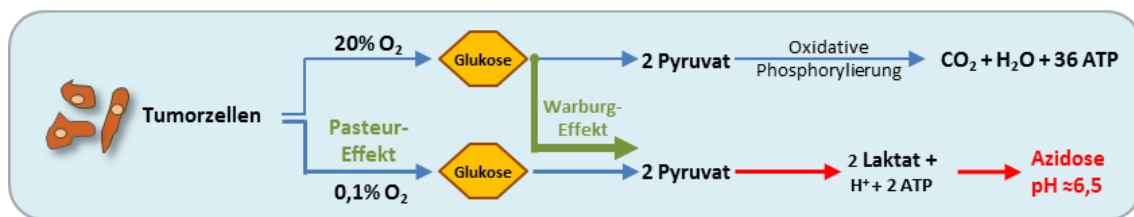
**Abb. 1:** NKZ-Suppression durch das Tumormikromilieu (adaptiert nach Stojanovic and Cerwenka, 2011). Tumorzellen sowie immunsuppressive Zellen (MDSCs, iDCs, Tregs und M2-polarisierte Makrophagen), lösliche (TGF- $\beta$ , *soluble*-NKG2D-Ligand, Laktat, IDO, PGE2, Kynurenin) und chemische Faktoren (pH<sub>low</sub>, hypoxischer Stress) des Tumormikromilieus wirken durch eine Vielzahl an Mechanismen inhibierend auf NK- und Effektor-T-Zellen. Diese wiederum können durch IFN- $\gamma$ -Sekretion und direkte Zytotoxizität maligne Zellen sowie u.a. MDSCs oder iDCs eliminieren und dadurch eine Toleranzinduktion verhindern bzw. eine Th1-Antwort induzieren.

Neben der Produktion immunsuppressiver Faktoren sind Tumorzellen zusätzlich in der Lage, der NKZ-vermittelten Zytotoxizität durch Herabregulierung oder Abstoßung verschiedener Zielstrukturen, wie etwa NKG2D-L oder NKp46-L, zu entkommen (Groh *et al.*, 2002; Salih, Rammensee and Steinle, 2002; Hilpert *et al.*, 2012). Intratumorale NK-, wie auch T-Zellen zeigten nach chronischer Antigen-Exposition einen erschöpften

Phänotyp mit einer vermehrte Expression inhibitorischer Rezeptoren, wie PD-1, CTLA-4 oder LAG-3 (Wherry, 2011).

### 1.3.2 Laktatazidose

Wie vielerorts beschrieben, beziehen Tumorzellen ihre Energie zu bis zu 50 % aus der sogenannten aeroben Glykolyse, d.h. sie wandeln 1 Molekül Glukose in 2 Moleküle Laktat und 2 H<sup>+</sup>-Ionen, um 2 Moleküle ATP zu generieren; im Gegensatz zur oxidativen Phosphorylierung, die eine Synthese von 36 ATP zur Folge hat (**Abb. 2**).



**Abb. 2:** „Metabolic Switch“ in Tumorzellen (adaptiert nach Damaghi, *et al.* 2015): Der Warburg-Effekt führt trotz Anwesenheit von O<sub>2</sub> zur anaeroben Glykolyse - man spricht von der „aeroben Glykolyse“. Dies resultiert in einem ineffizienten Metabolismus der Glukose zu Laktat und H<sup>+</sup>-Ionen und führt zu der klassischen Laktatazidose des Tumormikromilieus.

Dieser auf den ersten Blick ineffiziente Mechanismus, der sonst nur unter anaeroben Bedingungen auftritt und in Gegenwart von O<sub>2</sub> normalerweise inhibiert wird („Pasteur“-Effekt), ist ein Kennzeichen maligner Transformation und findet in Tumorzellen klassischerweise trotz ausreichender aerober Versorgung statt. Dieser bereits in den 1920er Jahren von Otto Warburg bezeichnete Vorgang wurde um viele neuere Erkenntnisse erweitert, die zusammengefasst als „Metabolic Switch“ bezeichnet werden. Eine Reihe Onkogene und Tumorsuppressorgene, wie etwa PI3K, AKT, mTOR, HIF-1α, NF-κB und c-Myc sind in diesen Prozess involviert und führen u.a. zur gesteigerten Expression von Glukosetransportern (GLUT) oder supprimieren die β-Oxidation von Fettsäuren (DeBerardinis, 2008; Denko, 2008; Hirschhaeuser, Sattler and Mueller-Klieser, 2011). Eine neuere Theorie hingegen propagiert den sogenannten „Reverse-Warburg-Effekt“ (Pavlides *et al.*, 2009), in dem der eigentliche Warburg-Effekt nicht in den Tumorzellen selbst, sondern vorrangig in tumorassoziierten Fibroblasten (TAF; Pavlides *et al.*, 2012) bzw. nur in schlechter oxygenierten Tumorzellen (Sonveaux *et al.*, 2008) stattfindet, welche sich durch den dabei entstehenden oxidativen Stress selbst in die Apoptose treiben. Im Rahmen dessen werden die hochenergetischen Endprodukte der „ineffizienten“ aeroben Glykolyse - Pyruvat und Laktat - besser

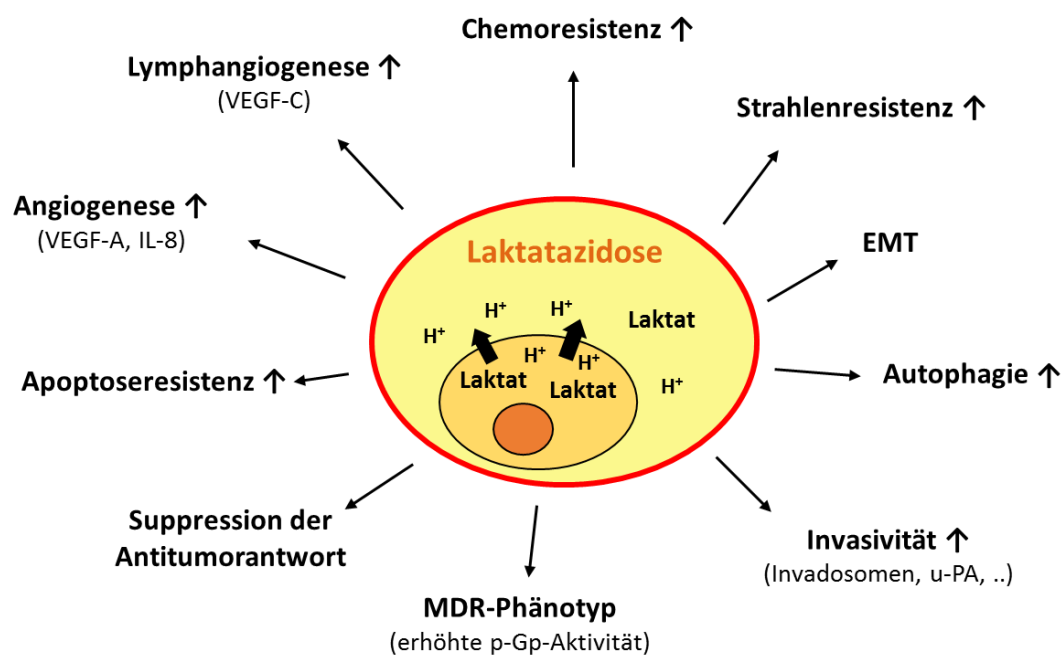
oxygenierten Tumorzellen mittels Monocarboxylattransportern (MCT1) zur Verfügung gestellt, welche diese nun wiederum zur „effizienteren“ oxidativen Phosphorylierung heranziehen können; eine Kombination dieser beiden Effekte ist wahrscheinlich. Zusammen mit weiteren Prozessen wie der geringen Gewebepерfusion durch unstrukturierte Vaskularisation und der unkontrollierten Proliferation hat der „*Metabolic Switch*“ zur Folge, dass exzessive Mengen Laktat und  $H^+$ -Ionen in den Extrazellularraum gelangen und zur für Malignome typischen Laktatazidose führen. Maligne Zellen selbst haben eine Reihe an Adaptationsmechanismen, um den intrazellulären pH ( $pH_i$ ) trotz erheblicher extrazellulärer Azidose/niedrigem  $pH_e$  konstant zu halten. Hierzu zählen neben physiologischen Säurepuffern, Metabolisierung von Säuren und Transport von Säuren in intrazelluläre Organellen vor allem  $H^+$ -Transporter, wie der  $Na^+/H^+$ -*Exchanger* 1 (NHE1), Carboanhydrasen (CAII, CAIX, CAXII),  $Na^+/HCO_3^-$ -Transporter (NBCs) oder MCTs (Parks, Chiche and Pouyssegur, 2013). Erst kürzlich wurde auf die Bedeutung des Lysosomen-assoziierten Membranprotein 2 (LAMP2) hingewiesen, welches maligne Zellen durch eine Art Darwin'sche Selektion säureresistenter Phänotypen proliferieren lässt, indem der  $pH_i$  durch Transport von überschüssigen  $H^+$ -Ionen aus dem Intrazellularraum in Lysosomen aufrechterhalten wird (Damaghi *et al.*, 2015). Die Lysosomen werden anschließend in den Extrazellularraum entleert und das dabei oberflächlich exprimierte LAMP2 fungiert gleichzeitig als Säurebarriere.

Es gibt keine Anzeichen dafür, dass Zellen des Immunsystems diese Adaptationsmechanismen, die sich in Tumoren über längere Zeiträume entwickeln, ebenfalls aufweisen.

### 1.3.3 Effekte der Laktatazidose

Die oben beschriebene Laktatazidose im Tumormikromilieu schafft durch eine Vielzahl an Mechanismen eine prognostisch ungünstige Situation. Sie unterstützt die Tumorprogression, indem sie u.a. durch eine höhere Mutationsrate die Metastaseninzidenz (Morita *et al.*, 1992; Walenta *et al.*, 2000; Gatenby and Gillies, 2004; Webb *et al.*, 2011; Damaghi, Wojtkowiak and Gillies, 2013) und lokale Invasion fördert (Gatenby and Gillies, 2008; Moellering *et al.*, 2008; Estrella *et al.*, 2013). Dies erfolgt einerseits durch die pH-abhängige Induktion der *Epithelial-to-Mesenchymal-*

*Transformation* (EMT; Peppicelli *et al.*, 2014) und der Sekretion und Aktivierung von Cathepsin B und L (Goretzki *et al.*, 1992; Rozhin *et al.*, 1994), welche unter anderem durch Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen und des Urokinase-Plasminogen-Aktivators (u-PA) zur Degradierung der Extrazellulärmatrix führen (Nagase and Woessner, 1999; Webb, Sherratt and Fish, 1999; Vihinen and Kähäri, 2002), sowie andererseits durch Stimulation der Bildung, Reifung und Funktion von Invadosomen (Brisson *et al.*, 2012) (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Effekte der Laktatazidose auf Tumor und Tumormikromilieu (adaptiert nach Peppicelli, Bianchini and Calorini, 2014). Sowohl Laktat als auch der niedrige intratumorale  $pH_e$  resultieren in einer gesteigerten Invasivität, Metastasierungsrate, Angiogenese und Apoptoseresistenz. Zusätzlich werden eine effektive Immunantwort sowie therapeutische Interventionen unterdrückt. Die Laktatazidose bildet damit eines der elementaren Merkmale maligner Transformation. (EMT: *Epithelial-to-Mesenchymal-Transformation*; u-PA: Urokinase-Plasminogen-Aktivator; MDR: *Multi-Drug-Resistant*; p-GP: p-Glykoprotein; VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*)

Begünstigt wird dies durch die Azidose-vermittelte Expression von IL-8, VEGF-A und -C und der daraus resultierenden Angio- und Lymphangiogenese (Xu and Fidler, 2000; Fukumura *et al.*, 2001; Shi *et al.*, 2001; Xu, Fukumura and Jain, 2002; Peppicelli and Bianchini, 2013). Weiters konnte gezeigt werden, dass ein niedriger intratumoraler pH durch höhere Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL (Kumar, Reusch and Ladilov, 2008; Ryder *et al.*, 2012) sowie chronische Autophagie intrazellulärer Organellen (Wojtkowiak *et al.*, 2012) zur Apoptoseresistenz maligner

Zellen führt. Diese sind - im Gegensatz zu Zellen des Immunsystems - in der Lage, sich durch Oberflächenexpression pH-resistenter, lysosomaler Moleküle vor den toxischen Einflüssen der Azidose zu schützen (Damaghi *et al.*, 2015).

Die Laktatazidose wurde als ein wichtiger Mechanismus der tumorvermittelten Immunsuppression identifiziert. Sie inhibiert die NKZ-Funktion (Lardner, 2001), führt zu einer erheblichen Beeinträchtigung zytotoxischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Mendler *et al.*, 2012) und greift in die Reifung und Antigenpräsentation dendritischer Zellen ein (Gottfried *et al.*, 2006). Zudem ermöglicht sie es Tumorzellen, sich therapeutischen Interventionen zu entziehen; so führt die Azidose zur Strahlen- (Röttinger and Mendonca, 1982) und Chemotherapieresistenz (Raghunand *et al.*, 2001) und induziert eine erhöhte Aktivität des p-Glykoproteins (p-Gp; Thews *et al.*, 2006) - man spricht vom *Multi-Drug-Resistant*- (MDR)-Phänotyp.

## 1.4 Zielsetzung

Da zu den Effekten der Azidose in Lymphomen bislang wenig bekannt ist, wurden die nachfolgenden Untersuchungen in einem Maus-Lymphom-Modell durchgeführt.

Hierzu wurden transgene Mäuse verwendet, die das Protoonkogen *c-myc* unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Enhancers der Ig $\lambda$ -Leichtkette tragen (Kovalchuk *et al.*, 2000). Infolgedessen entwickeln die Mäuse zwischen der 9. – 12. Lebenswoche aggressive B-Zell-Lymphome, die klinisch dem humanen Burkitt-Lymphom aus der Gruppe der Non-Hodgkin-Lymphome entsprechen.

Das in unserem Modell verwendete Lymphom führt zur progredienten Herabregulierung der Funktion von NKZ, wie anhand der IFN- $\gamma$ -Expression und der Zytotoxizität festgestellt werden konnte (Brenner *et al.*, 2010). Hierfür könnte die im Tumormikromilieu vorliegende Laktatazidose verantwortlich sein. Mittels oraler Applikation von Bikarbonat im Trinkwasser konnte diese nachweislich alkalisiert werden (Pötzl *et al.*, 2017). Dadurch wurde die IFN- $\gamma$ -Expression signifikant erhöht sowie die Überlebensdauer signifikant verlängert (Pötzl *et al.*, 2017).

Ziel der Arbeit war es: 1) die Abhängigkeit des verzögerten Tumorwachstums von NKZ zu ermitteln, 2) zu analysieren, ob die NKZ-Zytotoxizität hierbei eine Rolle spielt und 3) die dafür verantwortlichen Mechanismen zu charakterisieren und insbesondere in NKZ intrazelluläre Signalwege zu untersuchen, die diesen Effekt vermitteln könnten.

Hierfür wurde ein klinisch inapparentes Stadium *c-MYC*-tragender Mäuse definiert, in welchem äußerlich keine typischen Merkmale der Tumorerkrankung sichtbar sind, bei Analysen jedoch bereits eine aktive Antitumorantwort gezeigt werden konnte (Brenner *et al.*, 2010). Zudem ließ sich bei inapparenten Mäusen die inhibierte IFN- $\gamma$ -Expression von NKZ durch Rekonstitution in einem nicht-tumoralen Milieu wiederherstellen (Pötzl *et al.*, 2017). Dieses teilreversible Stadium eignete sich daher am ehesten zur Intervention. *c-MYC*-tragende Mäuse erhielten ab dem 35. Lebensstag entweder mit 200 mM NaHCO<sub>3</sub> versetztes oder weiterhin reguläres Leitungswasser und wurden zwischen Tag 80 und 85 abgetötet.

Somit ergaben sich zur Untersuchung der Fragestellungen vier Gruppen:

(1) Wildtyp (WT)-Maus

(2) Inapparente c-MYC-tragende Maus (c-MYC<sub>ina</sub>)

(3) Inapparente c-MYC-tragende Maus + NaHCO<sub>3</sub> (c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub>)

(4) Apparent kranke c-MYC-tragende Maus (c-MYC<sub>a</sub>)

Es wurden jeweils Milz, Lymphknoten und Blut entnommen.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

---

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte und Verbrauchsgegenstände

| Gerät/Verbrauchsgegenstand                      | Hersteller                         |
|---|------------------------------------|
| Accu-jet® pro                                   | Brand, Wertheim                    |
| Brutschrank BB6620                              | Heraeus Instruments, Hanau         |
| Brutschrank Hera Cell® 240                      | Heraeus Instruments, Hanau         |
| CryoTube® Gefäße 1,8 ml                         | Nunc, Wiesbaden                    |
| Durchflusszytometer LSR-II                      | Becton Dickinson, Heidelberg       |
| Einmalpipetten 5/10/25 ml                       | Greiner Bio-One, Frickenhausen     |
| Einmalzählkammer C-Chip                         | Peqlab, Erlangen                   |
| Eppendorf®-Thermomixer Compact                  | Sigma-Aldrich, St. Louis (USA)     |
| FACS-Röhrchen, klein                            | Greiner Bio-One, Frickenhausen     |
| Falcon® Nylon Zellsieb 40 µm                    | Becton Dickinson, Heidelberg       |
| Falcon® Polystyrol Rundboden-Gefäß mit Zellsieb | Becton Dickinson, Heidelberg       |
| Falcon® Röhrchen 15/50 ml                       | Becton Dickinson, Heidelberg       |
| Lichtmikroskop Leica DMIL                       | Leica Microsystems, Düsseldorf     |
| Lichtmikroskop Zeiss                            | Zeiss, Oberkochen                  |
| <i>LumaPlate</i> ®-96                           | Perkin Elmer, MA (USA)             |
| MACS-Säulen (MS, LS)                            | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| Mehrlochplatten 24/96                           | Becton Dickinson, Heidelberg       |
| Micro-Fine® Kanülen 0,5 ml                      | Becton Dickinson, Heidelberg       |

|   |  |
|---|--|
| Milli-Q®-Reinwasserherstellungssystem       | Millipore, Schwalbach                        |
| Omnifix® Latexfreie Spritzen 20 ml          | Becton Dickinson, Heidelberg                 |
| Petrischalen klein/mittel/groß              | Nunc, Wiesbaden                              |
| Pipetten 2/10/20/100/200/1000 µl            | Gilson, Limburg                              |
| Pipettenspitzen 10/200/1000 µl              | Zentrallager Helmholtz-Zentrum<br>Neuherberg |
| Plattenzentrifuge Labofuge 400              | Heraeus Instruments, Hanau                   |
| Reagenzglasschüttler Vortex Genie® 2        | Bachofer, Reutlingen                         |
| Reagenzglaszentrifuge 5424R                 | Eppendorf, Hamburg                           |
| Reaktionsgefäße 1,5/2 ml                    | Eppendorf, Hamburg                           |
| Spritzen Plastipack® 20 ml                  | Becton Dickinson, Heidelberg                 |
| Sterilbank                                  | BDK, Sonnenbühl-Genkingen                    |
| Stickstofftank                              | Air Liquid, Düsseldorf                       |
| Szintillationsmessgerät TOPCount®           | Canberra Packard, Dreieich                   |
| Umwälzthermostat                            | Julabo, Seelbach                             |
| Vortexrüttler MS2 Minishaker®               | IKA, Staufen                                 |
| Wasserbad                                   | Memmert, Schwabach                           |
| Zellkulturflasche 100; 60,1 cm <sup>2</sup> | TPP, Trasadingen (Schweiz)                   |
| Zentrifuge Megafuge® 1.0R                   | Heraeus Instruments, Hanau                   |
| Zentrifuge Rotanta® 460R                    | Hettich, Tuttlingen                          |

### 2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

| Reagenz/Chemikalie  | Hersteller                         |
|---|------------------------------------|
| Chrom <sup>51</sup> (Na <sub>2</sub> <sup>51</sup> CrO <sub>4</sub> ), 74 MBq | Hartmann Analytic,<br>Braunschweig |

|   |   |
|---|---|
| "B-Zell-Panning"-Kit                              | Monoklonale Antikörper<br>Plattform, Helmholtz-Zentrum<br>München |
| 10x <i>Permeabilization Buffer</i>                | eBioscience, Frankfurt  |
| Ammoniumchlorid                                   | Merck, Darmstadt  |
| ArC® <i>Amine Reactive Compensation Bead Kit</i>  | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| Brefeldin A                                       | eBioscience, Frankfurt  |
| Carbonatpuffer                                    | Monoklonale Antikörper<br>Plattform, Helmholtz-Zentrum<br>München |
| Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)      | Invitrogen, Carlsbad (USA)  |
| <i>Cytofix</i> ®                                  | Becton Dickinson, Heidelberg                                      |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                           | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)               | Merck, Darmstadt  |
| Fetales Kälberserum (FKS)                         | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| Formaldehyd 37 %                                  | Carl Roth, Frankfurt  |
| Formaldehydlösung 4 %                             | Merck, Darmstadt  |
| <i>FoxP3 Staining Buffer Set</i>                  | eBioscience, Frankfurt  |
| GolgiStop® Protein Transport Inhibitor (Monensin) | Becton Dickinson, Heidelberg                                      |
| Heparin-Natrium-25 000-ratiopharm®                | Krankenhausapotheke,<br>Klinikum Großhadern, München              |
| <i>IC Fixation Buffer</i>                         | eBioscience, Frankfurt  |
| Ionomycin (Calcium-Salz)                          | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| Kaliumhydrogencarbonat                            | Merck, Darmstadt  |
| L-Glutamin  | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| <i>Live/Dead</i> ® <i>Fixable Blue</i> -Lösung    | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| MEM Earle's (+ 20 mM HEPES)                       | Biochrom AG, Berlin   |

|   |   |
|---|---|
| MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100x)                                   | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| Natriumazid   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| Natriumhydrogencarbonat   | Monoklonale Antikörper<br>Plattform, Helmholtz-Zentrum<br>München |
| Natriumpyruvat  | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| <i>OneComp eBeads</i>   | eBioscience, Frankfurt  |
| Penicillin-Streptomycin   | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| <i>Perm Buffer IV 10x</i>   | Becton Dickinson, Heidelberg                                      |
| Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)   | Sigma-Aldrich, Taufkirchen  |
| <i>Phosphate Buffered Saline (PBS)</i>  | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| Rekombinantes Interleukin 15 (IL-15, murin)                                     | Peptotech Inc., Hamburg   |
| <i>Roswell-Park-Memorial-Institute</i> Medium 1640<br>(RPMI 1640) ohne Glutamin | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| Trypanblau  | Life Technologies, Frankfurt                                      |
| $\beta$ -Mercaptoethanol  | Life Technologies, Frankfurt                                      |

### 2.1.3 Medien und Puffer

| Medium/Puffer | Zusammensetzung                              |
|---------------|--|
| Basismedium   | RPMI 1640 ohne L-Glutamin                    |
|               | 5 / 10 % hitzeinaktiviertes FKS              |
|               | 100 U/ml Penicillin-G-Natrium                |
|               | 100 $\mu$ g/ml Dihydrostreptomycinsulfat     |
|               | 2 mM L-Glutamin                              |
|               | 1 mM Natriumpyruvat                          |
|               | 5 ml Nicht-essenzielle Aminosäuren<br>(100x) |

|                                       |  |
|---------------------------------------|--|
|                                       | 50 $\mu$ M $\beta$ -Mercaptoethanol  |
| NK-Zell-Medium                        | Basismedium mit 10 %<br>hitzeinaktiviertem FKS<br>50 ng/ml Interleukin-15  |
| Auftaumedium                          | Basismedium mit 20 %<br>hitzeinaktiviertem FKS   |
| Einfriermedium                        | 90 % hitzeinaktiviertes FKS<br>10 % DMSO   |
| Organmedium                           | MEM-Medium mit Earle's Salzen<br>20 mM HEPES   |
| Erythrozyten-Lysepuffer (10x, pH 7,4) | 8,25 g Ammoniumchlorid<br>1 g Kaliumhydrogencarbonat<br>37 mg Natrium-EDTA<br>ad 100 ml H <sub>2</sub> O (Millipore) |
| FACS-Puffer                           | PBS<br>2 % hitzeinaktiviertes FKS<br>2 mM EDTA<br>1 % Natriumazid  |
| MACS-Puffer                           | PBS<br>10 % hitzeinaktiviertes FKS<br>2 mM EDTA  |

## 2.1.4 Antikörper

### 2.1.4.1 Fluoreszenz-markierte Antikörper

Folgende für Maus-Antigene spezifische Antikörper wurden verwendet:

| Antigen       | Klon       | Isotyp                | Hersteller   |
|---------------|------------|-----------------------|--|
| NK1.1         | PK136      | Maus IgG2a, $\kappa$  | BD Biosciences   |
| CD3           | 17A2       | Ratte IgG2b, $\kappa$ | BD Biosciences   |
| CD19          | 1D3        | Ratte IgG2a           | BD Biosciences   |
| CD45R (B220)  | RA3-6B2    | Ratte IgG2a, $\kappa$ | BD Biosciences   |
| CD138 (CXCR3) | CXCR3-173  | Arm. Hamster IgG      | BioLegend  |
| Ki-67         | SolA15     | Ratte IgG2a, $\kappa$ | eBioscience  |
| Perforin      | eBioOMAK-D | Ratte IgG2a, $\kappa$ | eBioscience  |
| Granzym A     | GzA-3G8.5  | Maus IgG2b, $\kappa$  | eBioscience  |
| Granzym B     | NGZB       | Ratte IgG2a, $\kappa$ | eBioscience  |
| CD107a        | 1D4B       | Ratte IgG2b, $\kappa$ | BioLegend  |
| IFN- $\gamma$ | XMG1.2     | Ratte IgG1, $\kappa$  | BioLegend  |
| Fc-Rezeptor   |            | Ratte IgG2b           | „Monoklonale Antikörper“-<br>Plattform,<br>Helmholtz-<br>Zentrum München |

Zur Blockierung Fc-bindender Rezeptoren wurden entsprechende Antikörper freundlicherweise von der Plattform „Monoklonale Antikörper“, Helmholtz-Zentrum München zur Verfügung gestellt.

Zur Untersuchung phosphorylierter Signalmoleküle wurden diese erst mit Primär-Antikörper gebunden und anschließend mittels eines Fluorochrom-konjugierten Sekundär-Antikörpers markiert um sie durchflusszytometrisch zu analysieren.

| Antigen   | Klon       | Isotyp        | Hersteller        |
|---|------------|---------------|-------------------|
| Phospho-p44/42 (ERK1/2)<br>(Thr202/Tyr204)          | D13.14.4E  | Kaninchen IgG | CST               |
| Kaninchen IgG (H+L)<br>(Alexa Fluor®647-konjugiert) | Polyklonal | Ziege IgG     | Life Technologies |
| Phospho-SAPK/JNK<br>(Thr183/Tyr185)                 | G9         | Maus IgG1     | CST               |
| Maus IgG1<br>(Alexa Fluor®488-konjugiert)           | Polyklonal | Ziege IgG     | Life Technologies |
| Phospho-p38<br>(Thr180/Tyr182)                      | Polyklonal | Kaninchen     | CST               |
| Kaninchen IgG (H+L)<br>(Alexa Fluor®488-konjugiert) | Polyklonal | Ziege IgG     | Invitrogen        |

#### 2.1.4.2 Depletions-Antikörper

Zur In-vivo-Depletion der NKZ wurde folgender Antikörper verwendet:

| Antigen    | Klon       | Isotyp        | Hersteller  |
|------------|------------|---------------|-------------|
| Asialo-GM1 | Polyklonal | Kaninchen IgG | eBioscience |

#### 2.1.5 Kits

| Bezeichnung  | Hersteller                         |
|--|------------------------------------|
| <i>NK Cell Isolation Kit II, mouse</i>   | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach |
| <i>ProcartaPlex Mix&amp;Match, 8-Plex, mouse</i><br>(IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF) | eBioscience, Frankfurt             |

### 2.1.6 Mäuse

Sämtliche Tierversuche entsprachen geltenden Tierschutzbestimmungen und erfolgten unter der Genehmigung der zuständigen Behörde (Regierung von Oberbayern). Alle Mäuse wurden unter spezifiziert pathogenfreien Bedingungen in keimarmer Umgebung im Tierstall des Hämatologikums, Helmholtz-Zentrum München gehalten und erhielten Wasser sowie Nahrung ad libitum.

Zur Untersuchung der Fragestellungen wurde das auf C57BL/6-Hintergrund basierende c-MYC-Modell verwendet. Dabei handelt es sich um Mäuse, die das humane c-MYC unter der Kontrolle des B-Zell-spezifischen Enhancers für die Ig $\lambda$ -Leichtkette tragen. Dadurch kommt es in B-Zellen zur gesteigerten Expression des Protoonkogens *c-myc*, wodurch die Mäuse zwischen der 9. - 12. Lebenswoche spontane B-Zell-Lymphome entwickeln (Kovalchuk *et al.*, 2000). Die Erkrankung manifestiert sich in Form einer ausgeprägten Splenomegalie sowie einer vor allem mandibulär und axillär lokalisierten Lymphadenopathie.

Als Kontrolltiere dienten dabei C57BL/6-Mäuse ohne entsprechendes Transgen, die fortan als Wildtyp-[WT]-Mäuse bezeichnet werden.

### 2.1.7 Software

| Methode                    | Software                 | Hersteller                                 |
|----------------------------|--------------------------|--|
| Durchflusszytometrie       | BD FACSDiva <sup>®</sup> | Becton Dickinson, Heidelberg (GER)         |
|                            | FlowJo 8.8.6             | Treestar Inc., Ashland, OR (USA)           |
| Chrom[51]-Freisetzungstest | TopCount NXT             | Perkin Elmer, MA (USA)                     |
| Auswertung & Statistik     | GraphPad Prism 5         | Graphpad Software Inc., La Jolla, CA (USA) |
| Text & Abbildungen         | Adobe Illustrator CS5    | Adobe Systems, San José, CA (USA)          |



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zelllinien und -kultur

| Zelllinie | Beschreibung                         | Beschreibung                 |
|-----------|--------------------------------------|------------------------------|
| YAC-I     | MHC-I-defiziente T-Zell-Lymphomlinie | Kiessling <i>et al.</i> 1975 |
| 291       | B-Zell-Lymphomlinie                  | Brenner <i>et al.</i> 2009   |

Oben genannte Zellen wurden zum Auftauen für einen Tag in Auftaumedium gehalten. Zur Erhaltung der Zelllinien erfolgte eine Kultivierung in Petrischalen mit Basismedium (5 % FKS) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Alle zwei Tage wurde die Zellsuspension auf ihre Vitalität überprüft, im Verhältnis 1:10 verdünnt und rekultiviert. Die B-Zell-Lymphomlinie 291 wurde auf c-MYC-Hintergrund im Labor generiert.

### 2.2.2 Behandlung mit NaHCO<sub>3</sub>

Um die Auswirkung der Alkalisierung in den Mäusen zu untersuchen, erhielt die Versuchsgruppe ab dem 35. Lebenstag mit 200 mM NaHCO<sub>3</sub> versetztes Trinkwasser für einen Zeitraum von 45 Tagen ad libitum.

### 2.2.3 Organentnahme und Aufarbeitung

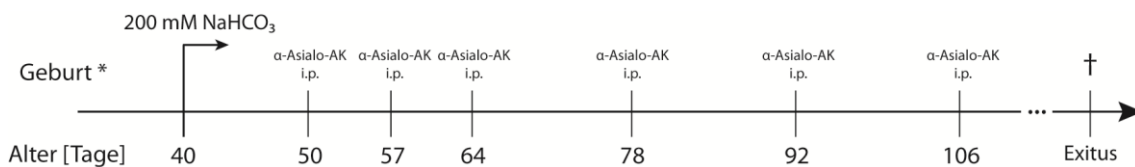
Nach Euthanasie der Mäuse mittels CO<sub>2</sub> wurden Milz, Lymphknoten (mandibulär, axillär, inguinal) sowie Blut aus der V. Cava Inferior bzw. dem Herzen entnommen.

Die Organe wurden durch ein Zellsieb in eine mit MEM Earle's Medium gefüllte Petrischale gedrückt und mithilfe einer Spritze auf- und abpipettiert, bis keine festen Bestandteile mehr sichtbar waren. Nach Erythrozytenlyse und mehreren Waschschritten mit PBS wurde die Zellzahl der Einzelzellsuspensionen mittels Einmalzählkammer bestimmt. Das Serum des entnommenen Blutes wurde durch

Abzentrifugieren von korpuskulären Bestandteilen getrennt und bei -30 °Celsius bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

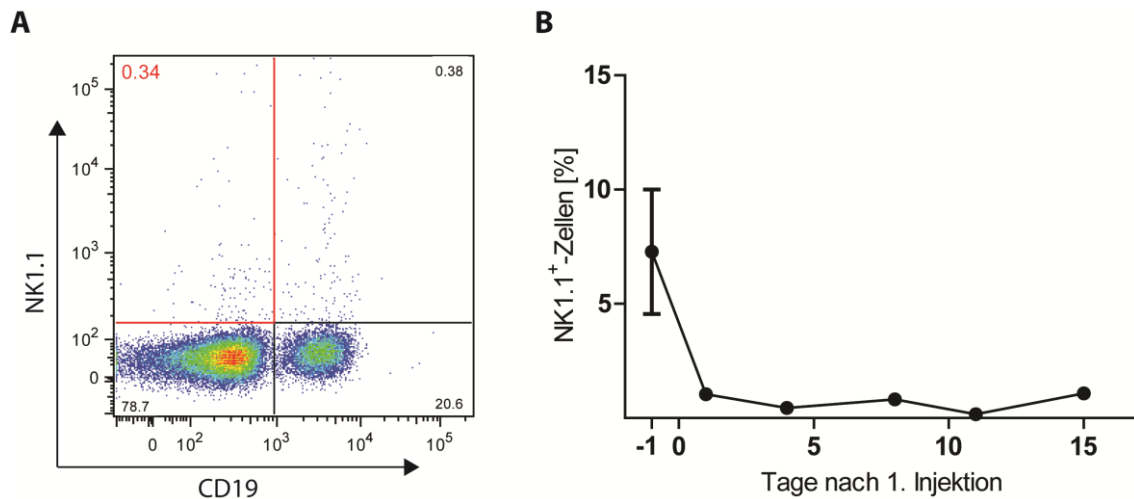
#### 2.2.4 NK-Zell-Depletion

Um NK-Zellen im Mausmodell zu depletieren, wurde o.g.  $\alpha$ -Asialo-GM1-Antikörper der Firma *eBioscience* verwendet. Asialo-GM1, ein sialinsäureloses Derivat des Glykosphingolipids Ganglio-N-Tetraosylceramid, agiert als Korezeptor pathogenvermittelter Immunaktivierung und wird auf NK-Zellen, frühen Thymozyten sowie neuronalem Gewebe exprimiert. In In-vivo Modellen dient es als Antigen zur vollständigen NK-Zell-Depletion (Kasai *et al.*, 1981). Der Antikörper wurde in 200  $\mu$ l PBS gelöst und 10 Tage nach Therapiebeginn mit Natriumbikarbonat mittels intraperitonealer (i.p. -) Injektion c-MYC-Mäusen appliziert. Nach zwei initial im Wochenabstand gegebenen Injektionen, erfolgte die Antikörpergabe daraufhin in zweiwöchigen Abständen, bis die Versuchstiere terminale Krankheitszeichen aufwiesen (**Abb. 4**).



**Abb. 4:** NK-Zell-Depletion mittels  $\alpha$ -Asialo-GM1-Antikörper. 10 Tage nach Therapiebeginn mit 200 mM NaHCO<sub>3</sub> erfolgte initial eine im Wochenabstand, später im zweiwöchigen Abstand gegebene i.p.-Applikation des  $\alpha$ -Asialo-GM1-Antikörpers, bis die Versuchstiere terminale Krankheitszeichen aufwiesen.

Zur Überprüfung der Depletion wurde der Versuchsgruppe in regelmäßigen Abständen 50  $\mu$ l Blut aus der Schwanzvene entnommen und heparinisiert. Die Proben wurden anschließend auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen gefärbt (**Abb. 5**).

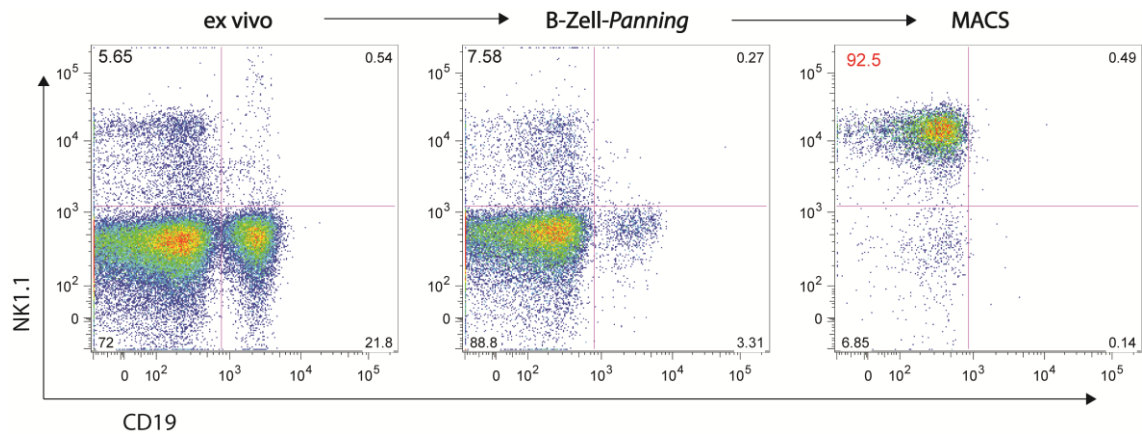


**Abb. 5:** Validierung der NK-Zell-Depletion mit NaHCO<sub>3</sub> therapiert c-MYC-Mäuse im peripheren Blut. **(A)** Exemplarische FACS-Analyse des NK-Zell-Anteils [%] 4 Tage nach Depletionsbeginn. **(B)** NKZ-Anteil [%] im Verlauf [Tage] vor und nach erster Injektion des  $\alpha$ -Asialo-GM1-Antikörpers. Darstellung der Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  SEM (n $\geq$ 2).

### 2.2.5 NK-Zell-Isolierung

Um NK-Zellen aus Zellsuspensionen von Milzen zu isolieren, wurde bei apparent kranken c-MYC-Mäusen ein „B-Zell-Panning“-Kit verwendet, welches freundlicherweise von der Plattform „Monoklonale Antikörper“ zur Verfügung gestellt wurde. Dazu wurden spezifische B-Zell-Antikörper in Carbonatpuffer gelöst, auf speziell beschichtete Petrischalen verteilt und über Nacht bei 4 °Celsius inkubiert. Daraufhin erfolgte ein mehrmaliges Waschen mit PBS sowie eine einstündige Inkubation der Zellsuspensionen bei 4 °Celsius.

Anschließend wurde das „NK Cell Isolation Kit II, mouse“ von Miltenyi Biotec gemäß Protokoll des Herstellers verwendet – ein negatives Isolierungskit, welches darauf basiert, alle ungewünschten Zellpopulationen mit primären Biotin-konjugierten Antikörper zu markieren, um diese mittels sekundären *MicroBeads*-konjugierten  $\alpha$ -Biotin-Antikörpern in einer magnetischen Säule zu fixieren. Dabei ließ sich eine Reinheit von durchschnittlich 90 – 95 % NK1.1<sup>+</sup>-Zellen erreichen (**Abb. 6**).



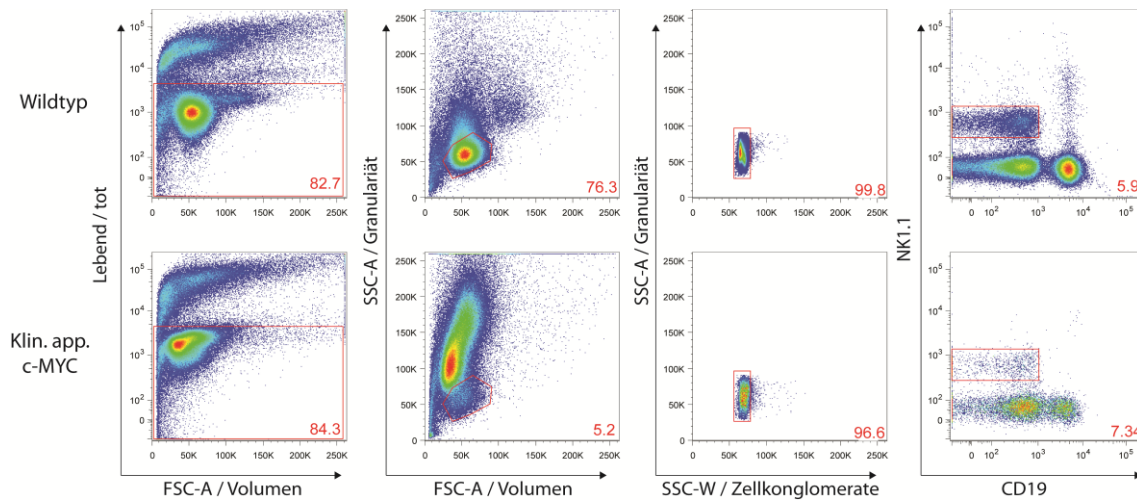
**Abb. 6:** NK-Zell-Isolierung aus Milzen untersuchter Versuchstiere. Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse ex vivo, nach B-Zell-Panning sowie nach Anwendung des *NK Cell Isolation Kit II* (MACS). Die Proben wurden auf NK1.1<sup>+</sup>- sowie CD19<sup>+</sup>-Zellen angefärbt. Die Reinheit betrug im Durchschnitt zwischen 90-95 % NK1.1<sup>+</sup>-Zellen.

## 2.2.6 Durchflusszytometrie

Zur durchflusszytometrischen Bestimmung von Oberflächenantigenen wurden  $1-2 \times 10^6$  Zellen der jeweiligen Einzelzellsuspensionen (Milz, Lymphknoten) für 25 min mit in PBS gelösten Fluoreszenz-markierten Antikörpern bei 4 °Celsius inkubiert. Zur Unterscheidung lebender von toten Zellen wurde die *Live/Dead® Fixable Blue*-Lösung verwendet.

Zur Detektion des Füllungszustandes zytotoxischer Granula (Granzym A, Granzym B, Perforin) wurden je  $2 \times 10^6$  Zellen in Basismedium (10 % FKS) aufgenommen und für 4 h im Brutschrank bei 37 °Celsius und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Proben wurden dazu mit PMA, Ionomycin und Brefeldin A (jeweils 1:1000), bzw. nur Brefeldin (1:1000, Negativkontrolle) versetzt. Anschließend erfolgte nach o.g. Oberflächenmarkierung eine Fixierung der Zellen mittels *IC Fixation Buffer* (30 min, 4 °Celsius) und Permeabilisierung durch mehrmaliges Waschen mit *1x Permeabilization Buffer*. Bei Verwendung von Maus-Antikörpern wurden die Zellen an dieser Stelle mit einem Antikörper zur Blockierung Fc-bindender Rezeptoren inkubiert (20 min, 4 °Celsius). Die Fluoreszenz-Markierung der gewünschten intrazellulären Antigene wurde daraufhin durch Inkubation mit in *1x Permeabilization Buffer* gelösten Antikörpern erreicht (40 min, 4 °Celsius). Zur Färbung nukleärer Antigene (Ki-67) erfolgte eine reguläre Oberflächenmarkierung und Fixierung. Zur Permeabilisierung wurde jedoch aufgrund der nukleären Lokalisation von Ki-67 das „*FoxP3 Staining Buffer Set*“ verwendet.

Die angefärbten Zellen wurden bis zur Vermessung in FACS-Puffer bei 4 °Celsius aufbewahrt. Die Analyse der Proben erfolgte maximal zwei Tage nach Markierung am Durchflusszytometer LSR-II, BD. Zur Vergleichbarkeit der Versuche wurden jeweils dieselben Einstellungen verwendet (**Abb. 7**).

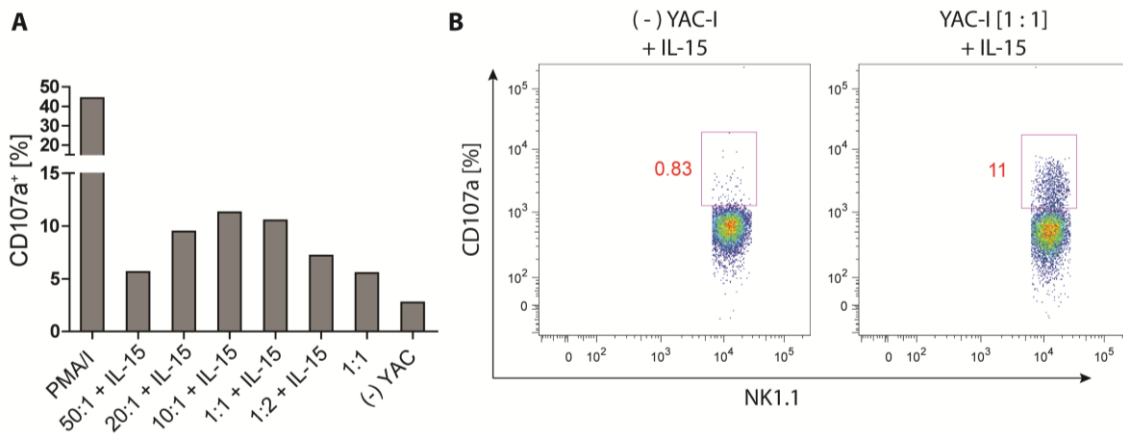


**Abb. 7:** Gatingstrategie der FACS-Analyse untersuchter Versuchsgruppen (obere Reihe: Wildtyp-, untere Reihe: Klin. app. c-MYC-Maus). Nach Selektion aller lebenden Zellen (*Live/Dead<sup>®</sup> Fixable Blue*) wurde mittels Vor- und Seitwärtsstreuung (*FSC / SSC*) die jeweilige Lymphozytenpopulation abgegrenzt, Zellkonglomerate ausgeschlossen und gegen CD19 gefärbt, um die gewünschte NK1.1<sup>+</sup>-Zell-Population zu erhalten.

### 2.2.7 Zytotoxizität: CD107a-Messung

Zur Bestimmung der funktionalen Degranulation von NK-Zellen wurde das lysosomale Membranprotein CD107a (LAMP-1) herangezogen. Dafür wurden  $2 \times 10^6$  Zellen aus Einzelzellsuspensionen von Milz und Lymphknoten in Basismedium (10 % FKS) aufgenommen. Die Proben wurden mit IL-15, Brefeldin A und Monensin (je 1:500), sowie  $\alpha$ -CD107a-Antikörper (1:250) versetzt und mit YAC-I-Zellen für 5 h bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Oberflächenfärbung (s.o.), Fixierung der Zellen mit 4 % Formaldehyd sowie die Vermessung am Durchflusszytometer LSR-II.

Bei der Etablierung der Methode zeigte sich ein Effektor : Zielzellverhältnis von 1 : 1 mit  $2 \times 10^6$  YAC-I-Zellen + IL-15 als die günstigste Variante und wurde fortan für alle weiteren Versuche verwendet (**Abb. 8**).



**Abb. 8:** Etablierung des CD107a-Degranulierungsversuches. **(A)** Zellsuspensionen aus Milzen wurden in verschiedenen Effektor : Zielzellverhältnissen  $\pm$  IL-15 bzw. PMA / Ionomycin für 5 h mit YAC-I-Zellen koinkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Versuchen ( $n \geq 10$ ). **(B)** Exemplarische Darstellung der CD107a-Expression ohne bzw. mit YAC-I-Zielzellen.

### 2.2.8 Zytotoxizität: Chrom-[51]-Freisetzung

Zur Ermittlung der spezifischen Lyse von NKZ wurde der Chrom-[51]-Freisetzungstest durchgeführt. Dazu erfolgte eine Isolierung der NKZ-Population aus den Spendermilzen gemäß oben beschriebener Prozedur sowie anschließender Über-Nacht-Kultur in NKZ-Medium (10 % FKS + 50 ng/ml IL-15). Am folgenden Tag wurden  $2 \times 10^6$  YAC-I-Zellen, welche aufgrund ihrer MHC-Defizienz standardmäßig als Ziel für NKZ verwendet werden, in 100 % FKS aufgenommen und durch 1 ½-stündiges Inkubieren (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) mit 50  $\mu$ Ci Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub> beladen. Nach Ernten der NKZ wurden diese erneut in NKZ-Medium aufgenommen, in der jeweiligen Verdünnung auf eine 96-Rundlochplatte aufgetragen und mit je  $2 \times 10^3$  beladenen YAC-I-Zellen für 4 Stunden koinkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Anschließend wurden die Überstände der Kokultur (50  $\mu$ l) auf eine *LumaPlate*<sup>®</sup> (mit Szintillator beschichtete Messplatte) übertragen, und nach Über-Nacht-Trocknen der Probenplatte wurde diese am Szintillationsmessgerät TopCount<sup>®</sup> analysiert. Zur Messung der Maximalwerte wurden beladene YAC-I-Zellen direkt auf die *LumaPlate*<sup>®</sup> übertragen, zur Messung der Spontanwerte nur mit NKZ-Medium kultiviert.

Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte dabei gemäß der Gleichung:

$$\text{Spezifische Lyse [\%]} = \frac{(\text{Gemessene Freisetzung} - \text{Spontanfreisetzung})}{(\text{Maximale Beladung} - \text{Spontanfreisetzung})} * 100$$

### 2.2.9 Messung von phosphorylierten Proteinen

Zur Darstellung intrazellulärer, temporär phosphorylierter Signalmoleküle der MAPK-Familie (*Mitogen-activated protein kinase: ERK, JNK, p38*) wurde ein Protokoll in Anlehnung an das BD Phosflow®-System entwickelt. Dazu wurden von je  $2 \times 10^6$  Zellen aus Einzelzellsuspensionen der Spendermilzen zuerst Oberflächenantigene angefärbt, die Proben anschließend in Basismedium (10 % FKS) mit PMA und Ionomycin (je 1:500 verdünnt) bzw. ohne Stimulus im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) und nach entsprechenden Zeiträumen (0 bis 60 min) mit BD Cytofix® im jeweiligen Zustand fixiert (15 min, 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Daraufhin wurden die Zellen mit 0,5x BD Perm Buffer IV permeabilisiert (700 µl, 30 min, RT) und die intrazellulären Antigene erst primär (unkonjugiert), dann sekundär (Fluorochrom-konjugiert) markiert (je 40 min, 4 °C; s. **Tab. 2.1.4.2**). Als Kontrolle dienten unstimulierte Proben zum Zeitpunkt  $t = 0$  min sowie lediglich sekundär markierte Zellen zur Abgrenzung unspezifischer Detektion. Bis zur durchflusszytometrischen Vermessung der Proben am LSR-II waren diese bei 4 °C in 200 µl FACS-Puffer gelöst.

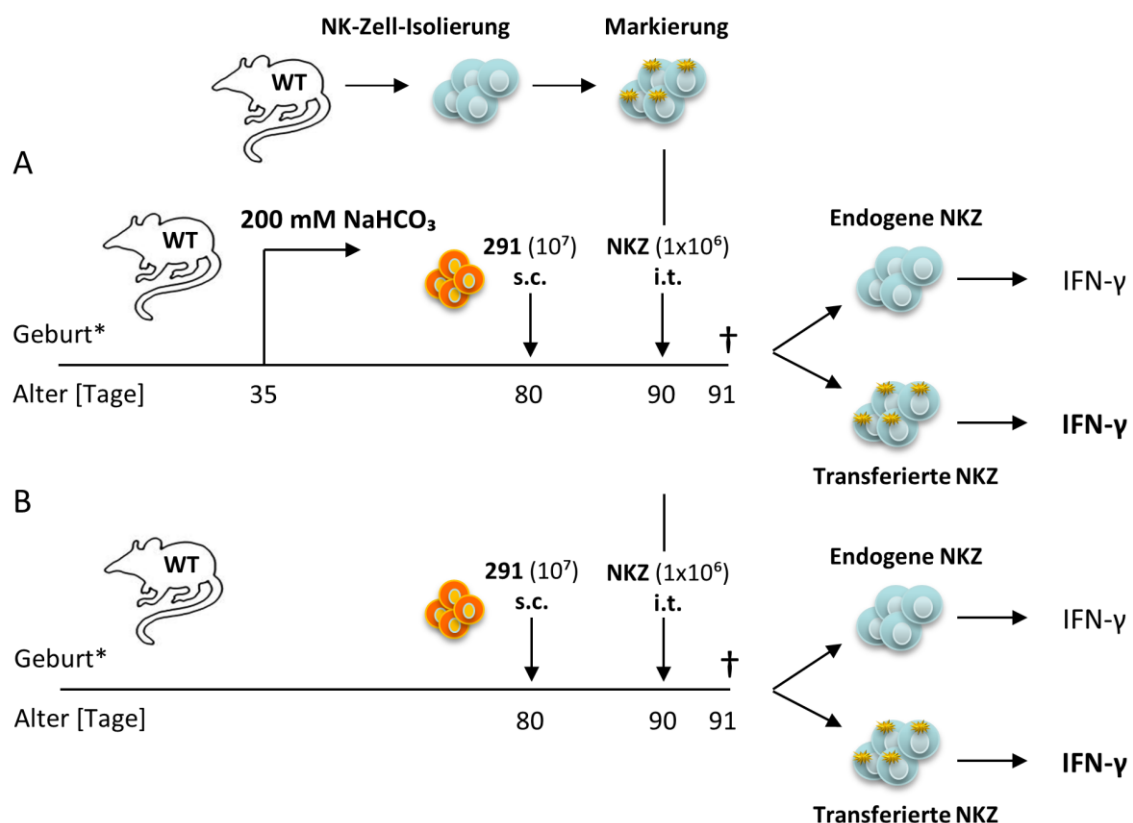
### 2.2.10 Färbung mit Proliferation Dye / CFDA-SE / CFSE

5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester (CFSE) bindet als fluoreszierender Farbstoff intrazellulär kovalent vor allem an Lysinreste und wird daher in vivo zur Langzeit-Markierung von Zellpopulationen verwendet (Lyons and Parish, 1994). Seine stärker permeable Vorstufe Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFDA-SE) unterscheidet sich lediglich durch zwei Acetatgruppen, welche durch intrazellulären Esterasen abgespalten werden. Um die Interferenz mit anderen fluoreszierenden Antikörpern möglichst gering zu halten, wurde *Proliferation Dye eFluor® 450* (CPD) verwendet – ein CFDA-SE-Analogon mit Exzitationsspitze bei 409 nm. Zur Markierung von NKZ wurden diese nach oben beschriebener Isolierung für 10 min mit *Proliferation Dye eFluor® 450* (Konz.: 20 µM) bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert, mit 10 % FKS verdünnt für 5 min auf Eis gestellt, mehrmals mit PBS gewaschen und anschließend zur weiteren Verwendung bearbeitet.

### 2.2.11 Adoptiver NK-Zell-Transfer

Um die Auswirkungen eines alkalisierten Tumormilieus auf exogene, transferierte NKZ zu beobachten, wurde folgendes Modell entwickelt:

Wildtyp-Mäuse wurden für einen Zeitraum von ca. 45 Tagen mit 200 mM NaHCO<sub>3</sub> versetztem Trinkwasser gefüttert und erhielten anschließend eine Tumorlast von 10<sup>7</sup> 291-Zellen, welche subkutan in die rechte bzw. linke Flanke injiziert wurden. Nach Anwachsen des Tumors (8 bis 15 Tage später; ca. Ø 8 mm) wurden unbehandelten WT-Mäusen Milzen entnommen, die jeweiligen NKZ isoliert sowie mit CPD markiert (s. oben), um 1 x 10<sup>6</sup> dieser anschließend intratumoral zu applizieren. 24 h später erfolgte die Entnahme des subkutanen Tumors mit FACS-Analyse endogener sowie markierter, transferierter NKZ auf ihre IFN-γ-Expression. Als Kontrolle dienten dabei NKZ unbehandelter WT-Mäuse, die der gleichen Prozedur unterzogen wurden (**Abb. 9**).



**Abb. 9:** Adoptiver NKZ-Transfer in einem implantierbaren Lymphommodell. Nach Anwachsen der s.c. applizierten 291-Tumorzelllinie in behandelten Versuchstieren (**A**) wurden isolierte, CPD-markierte NKZ gesunder, unbehandelter WT-Donoren intratumoral appliziert. 24 h später konnte die IFN-γ-Expression endogener und transferierter NKZ nach Tumorentnahme durchflusszytometrisch analysiert und verglichen werden. Als Kontrolle dienten dabei ungefütterte WT-Mäuse (**B**).



### 2.2.12 Zytokin-Analyse

Zur Analyse des Zytokinmilieus im Blut wurde gemäß oben beschriebenem Verfahren Serum gewonnen und mittels *ProcartaPlex Mix&Match, 8-Plex, mouse (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , TNF)* der Firma *eBioscience* vermessen. An magnetische Körper gebundene Fängerantikörper in der Messplatte binden dabei den zu untersuchenden Analyten, bis überschüssiges Protein ausgewaschen wurde. Anschließend wird aus Analyt, Fängerantikörper sowie biotinyliertem Detektionsantikörper ein *Sandwich-Komplex* (vgl. *Sandwich-ELISA*) gebildet. Als fluoreszierender Indikator wird im letzten Schritt ein Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugat hinzugefügt, welches an o.g. Detektionsantikörper bindet und damit in der Lage ist, geringste Mengen des zu untersuchenden Analyten nachzuweisen. Die Anwendung erfolgte gemäß Protokoll des Herstellers.

### 2.2.13 Statistik

Statistisch signifikante Unterschiede wurden grafisch durch einen (\*,  $p \leq 0,05$ ), zwei (\*\*,  $p \leq 0,01$ ), drei (\*\*\*,  $p \leq 0,001$ ) oder vier (\*\*\*\*,  $p \leq 0,0001$ ) Sterne gekennzeichnet. Nicht-signifikante Ergebnisse wurden durch *ns* markiert oder nicht gesondert ausgewiesen. Um die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben zu vergleichen, wurde der Zweistichproben-t-Test angewandt. Voraussetzung dafür war, dass die Varianz der zu vergleichenden Grundgesamtheiten gleich war. War dies nicht der Fall, wurde die Korrektur nach Welch miteinbezogen. Der Vergleich einer mit mehreren anderen Gruppen wurde mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) errechnet. Dabei wurde eine Normalverteilung der Stichproben angenommen. Zur Analyse der Kaplan-Meier-Überlebenskurven wurde der *Log-Rank-Test* angewandt. Die Berechnung der statistischen Werte erfolgte durch das Programm *GraphPad Prism 5*.

### 3 ERGEBNISSE

---

Vorangehende Untersuchungen der Arbeitsgruppe konnten bereits zeigen, dass der endogen wachsende Tumor im hier verwendeten Modell sowohl die IFN- $\gamma$ -Expression als auch die Zytotoxizität in NKZ herabreguliert. Wie *in vivo* bereits in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, werden auch aus WT-Donoren gewonnene NKZ durch Transplantation in endogen wachsende c-MYC-Tumoren in ihrer IFN- $\gamma$ -Expression erheblich gehemmt. Dieser Funktionsverlust wird vermutlich auch durch die im Tumormikromilieu vorliegende Laktatazidose vermittelt und konnte *in vitro* durch Rekonstitution in pH-neutralem, tumorfreiem Medium rückgängig gemacht werden (Pötzl *et al.*, 2017). Durch Bikarbonatgabe konnte der intratumorale pH nachweislich neutralisiert und die IFN- $\gamma$ -Expression in NKZ gesteigert werden; dabei zeigte sich ein erheblicher Überlebensvorteil von mit Bikarbonat behandelten c-MYC-positiven Mäusen (Pötzl *et al.*, 2017).

c-MYC-positive Mäuse erhielten ab Tag 35 entweder mit 200 mM Natriumbikarbonat versetztes oder weiterhin reguläres Trinkwasser und wurden zwischen Tag 80 und 85 abgetötet. Hierbei zeigten sich äußerlich keine typischen Merkmale der Tumorerkrankung (*klinisch-inapparent; c-MYC<sub>ina</sub>*), bei Voruntersuchungen konnte jedoch bereits eine aktive Antitumorantwort festgestellt werden (Brenner *et al.*, 2010). Als Kontrolle dienten c-MYC-positive Mäuse mit äußerlichen Krankheitszeichen (*klinisch-apparent; c-MYC<sub>a</sub>*).

Die nachfolgenden Ergebnisse sollen die Untersuchungen der zugrundeliegenden Mechanismen darstellen.

### 3.1 Intratumorale NK-Zellzahl

Bei Durchführung durchflusszytometrischer Versuche wurde die relative Anzahl von NKZ in Zellsuspensionen gewonnener Milzen und Lymphknoten (LK) gemessen, da eine höhere NK-Zellzahl in soliden Tumoren als prognostisch günstig beschrieben wurde (Coca *et al.*, 1997; Deschoolmeester *et al.*, 2010). Dafür wurde jeweils dieselbe Gatingstrategie beibehalten, um Vergleichbarkeit herzustellen. Nach Selektion der lebenden Zellen (*Live/Dead-Fixable Blue*) wurde mittels NK1.1-Antikörper die gewünschte NK-Zellpopulation markiert (siehe „*Material und Methoden*“).

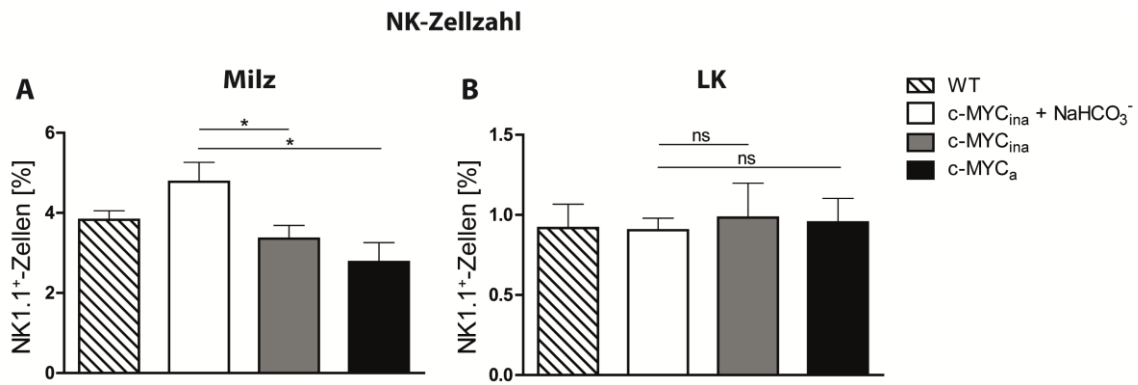
#### 3.1.1 Natriumbikarbonat führt zu erhöhter NK-Zellzahl in Milzen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass die orale Applikation von  $\text{NaHCO}_3$  zur Alkalisierung des intrasplenalen pH-Wertes führt (Pötzl *et al.*, 2017). Nun sollte untersucht werden, ob dieser Effekt Auswirkungen auf die NK-Zellzahl in Milzen therapeutischer Mäuse hat.

Die hierbei gemessene relative NK-Zellzahl in Milzen behandelter c-MYC-Mäuse war signifikant höher als die ihrer beiden Vergleichsgruppen (**Abb. 10A**). WT-Milzen wiesen im Mittel ca. 3,8 % NK1.1<sup>+</sup>-Zellen auf, mit  $\text{NaHCO}_3$  behandelte inapparente c-MYC<sub>ina</sub> 4,8 %, unbehandelte inapparente c-MYC<sub>ina</sub> 3,4 % sowie unbehandelte apparente c-MYC<sub>a</sub> 2,8 %. Die Anzahl an NKZ im wachsenden Tumor scheint mit fortschreitendem Krankheitsstadium abzunehmen. Dies steht im Kontrast zu bisherigen Untersuchungen (Przewoznik *et al.*, 2012).

#### 3.1.2 NK-Zellzahl in Lymphknoten unverändert

Lymphknoten aller untersuchten Versuchsgruppen wiesen im Mittel ca. 1 % NK1.1<sup>+</sup>-Zellen auf. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Die in der Milz beobachtete erhöhte NK-Zellzahl konnte damit in Lymphknoten nicht nachgewiesen werden (**Abb. 10B**). Es ist aktuell unklar, wie es zur Divergenz der NK-Zellzahl in Milz bzw. Lymphknoten kommt.

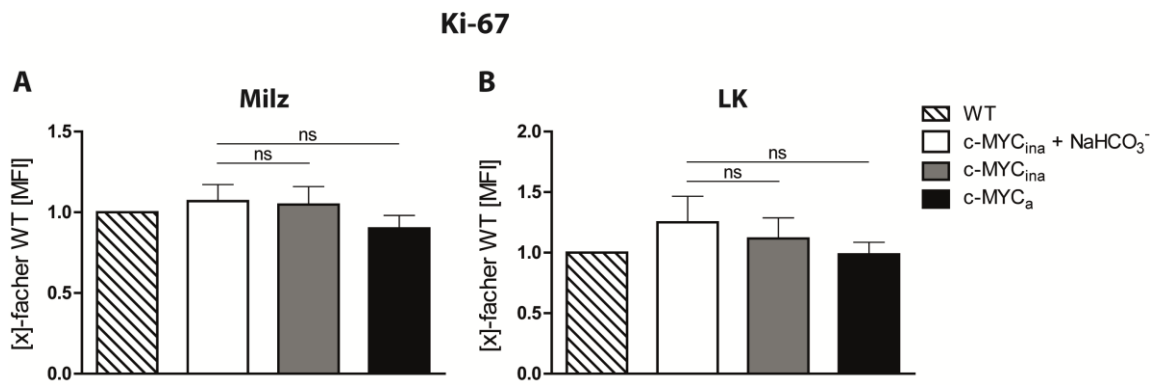


**Abb 10:** Relative NK-Zellzahl [%] in Milz **[A]** und Lymphknoten **[B]** der untersuchten Versuchsgruppen. Milzen von mit NaHCO<sub>3</sub> behandelten Mäusen wiesen eine signifikant höhere Anzahl von NKZ ( $4,8 \pm 1,4$  % [n=8]) auf als ihre Kontrollgruppen (c-MYC<sub>ina</sub>:  $3,4 \pm 0,9$  % [n=7]; c-MYCa:  $2,8 \pm 2,0$  % [n=18]). In Lymphknoten konnte keine signifikante Differenz nachgewiesen werden. (A: n $\geq$ 7; B: n $\geq$ 4; \*  $p \leq 0,05$ ; Darstellung als Mittelwert + SEM)

### 3.2 Intratumorale NKZ-Proliferation ist therapieunabhängig

Nun stellte sich die Frage, ob die beobachtete erhöhte NK-Zellzahl durch gesteigerte lokale Proliferation oder vermehrte Migration verursacht wird. Zur Untersuchung der Proliferation wurde die Expression des nukleären Antigens und Proliferationsmarkers Kiel-67 (Ki-67) analysiert. Ki-67 wird nur während aktiver Teilungsphasen (G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase) von Zellen exprimiert und eignet sich damit hervorragend zur Bestimmung der proliferativen Fraktion einer Zellpopulation (Bruno and Darzynkiewicz, 1992). Die Bestimmung von Ki-67 findet auch in der klinischen Routinediagnostik Anwendung.

Bei Analyse der Ki-67-Expression in NK1.1<sup>+</sup>-Zellen zeigte sich jedoch weder in Milz (**Abb. 11A**) noch Lymphknoten (**Abb. 11B**) ein signifikanter Unterschied. Eine ursächliche gesteigerte, lokale Proliferation konnte daher als unwahrscheinlich angesehen werden.



**Abb. 11:** Analyse der Ki-67-Expression von NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in **(A)** Milz und **(B)** Lymphknoten untersuchter Versuchsgruppen. Es konnte keine gesteigerte Proliferation im Vergleich zur WT-Kontrolle nachgewiesen werden. (n≥6; Darstellung als [x]-facher WT-Wert des jeweiligen Versuches + SEM)

### 3.3 Intratumorale NKZ-Migration

Zur Untersuchung des Migrationsverhaltens von NK1.1<sup>+</sup>-Zellen wurde die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CXCR3 analysiert. Wie unsere Arbeitsgruppe bereits zeigen konnte, wird dieser durch Interaktion mit den Chemokinen CXCL-9/CXCL-10 internalisiert und ist maßgeblich für die *in vivo* stattgefundene NKZ-Migration verantwortlich (Robertson, 2010; Przewoznik *et al.*, 2012).

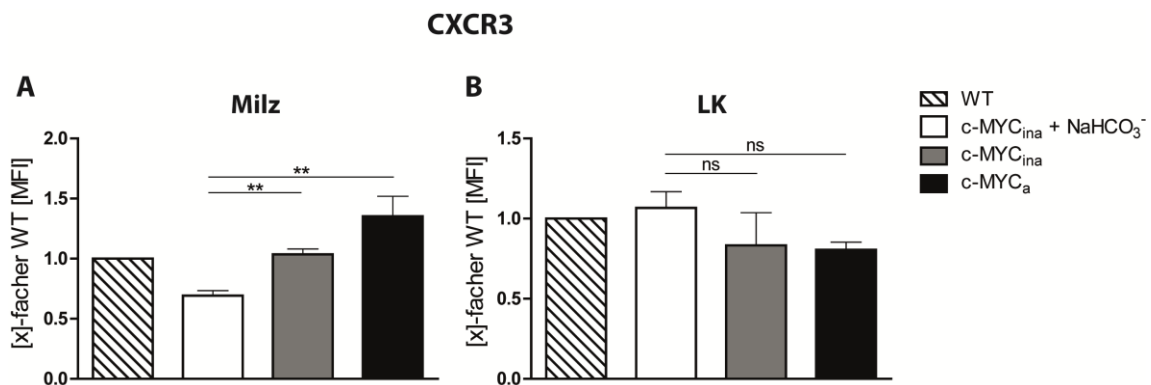
#### 3.3.1 Therapie führt in Milzen zur Internalisierung von CXCR3

Die orale Applikation von NaHCO<sub>3</sub> resultierte in einer signifikant ( $p < 0,01$ ) verminderten Oberflächenexpression von CXCR3 auf NKZ in behandelten gegenüber unbehandelten c-MYC<sub>ina</sub> sowie c-MYC<sub>a</sub>. So wiesen aus Milzen gewonnene NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in behandelten c-MYC<sub>ina</sub> etwa 70 % des WT-Wertes aus der gleichen Versuchsgruppe auf. Unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> zeigten ca. 100 %, unbehandelte c-MYC<sub>a</sub> ca. 140 % des WT-Wertes (**Abb. 12A**). Dies steht im Einklang mit der beobachteten, gesteigerten NK-Zellzahl in Milzen therapeutischer Mäuse.

#### 3.3.2 CXCR3-Expression in Lymphknoten ist nicht therapieabhängig

Die CXCR3-Expression aus Lymphknoten gewonnener NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in behandelten c-MYC<sub>ina</sub> wies ca. 110 % des WT-Wertes aus der gleichen Versuchsgruppe auf. Unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> und c-MYC<sub>a</sub> zeigten ca. 80 % des WT-Wertes (**Abb. 12B**). Die

Unterschiede waren nicht signifikant. Damit konnte die CXCR3-vermittelte Migration NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in Lymphknoten therapiertter Mäuse über diesen Signalweg, entsprechend der unveränderten NK-Zellzahl, ausgeschlossen werden. Das unterschiedliche Migrationsverhalten in Lymphknoten bzw. Milz bedarf weiterer Untersuchungen.

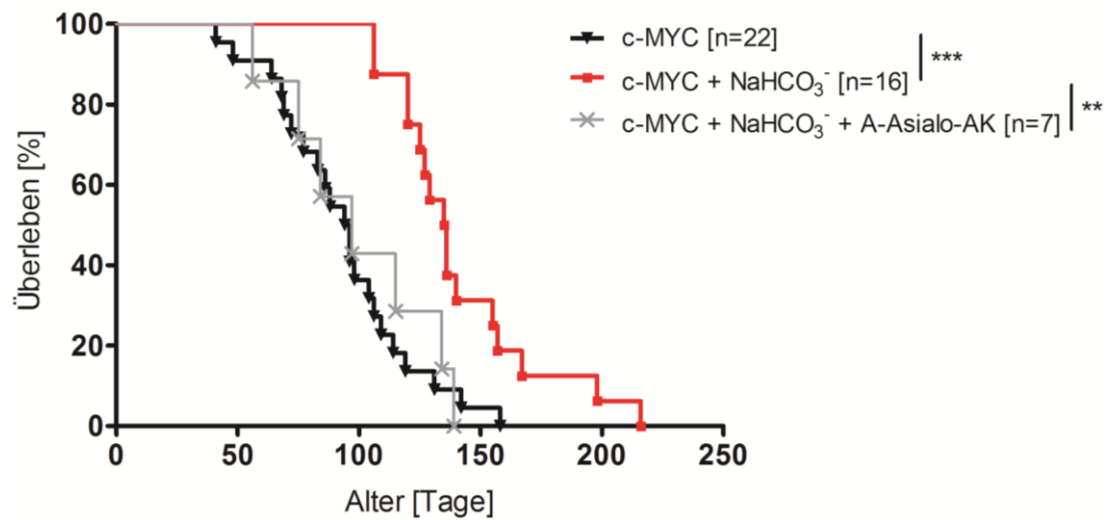


**Abb. 12:** Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors CXCR3 auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in **(A)** Milz und **(B)** Lymphknoten untersuchter Versuchsgruppen. Orale Applikation von NaHCO<sub>3</sub> hatte in Milzen eine signifikant verminderte Oberflächenexpression von CXCR3 auf NKZ zur Folge. (c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: 69,2 ± 9,4 %; c-MYC<sub>ina</sub>: 103,6 ± 7,7 %; c-MYC<sub>a</sub>: 135,2 ± 44,0 %; n≥4; \*\* p≤0,01; Darstellung als [x]-facher WT-Wert des jeweiligen Versuches + SEM)

### 3.4 Therapievermitteltes Überleben ist NKZ-abhängig

Im Rahmen von Voruntersuchungen hatte sich gezeigt, dass die in der Arbeit angewandte Behandlung mit 200 mM NaHCO<sub>3</sub> zu einem hochsignifikanten Überlebensvorteil in c-MYC-tragenden Mäusen führt. Es stellte sich nun die Frage, ob das verzögerte Tumorwachstum und der beobachtete Überlebensvorteil auf die oben beschriebene erhöhte NK-Zellzahl zurückzuführen sei. Dazu wurde die NK1.1<sup>+</sup>-Zellpopulation gemäß bestehenden Protokollen mittels Anti-Asialo-GM1-Antikörper (Kasai *et al.*, 1981) depletiert. Die intraperitoneale Injektion erfolgte 10 Tage nach Therapiebeginn in initial ein-, später zweiwöchigen Abständen, bis die Versuchstiere bei Aufweisen von terminalen Krankheitszeichen euthanasiert wurden. Durch regelmäßige Entnahme und Analyse peripheren Blutes über die Schwanzvene wurde der Depletionserfolg kontrolliert (siehe „Material und Methoden“).

Dabei zeigte sich eine vollständige Reversibilität des Überlebensvorteils mit  $\text{NaHCO}_3$  therapierter c-MYC-Mäuse (**Abb. 13**). Dies lässt den Schluss zu, dass insbesondere die NKZ-Fraktion bei der körpereigenen Immunabwehr eines endogen wachsenden Tumors eine essenzielle Rolle spielt.



**Abb. 13:** Kaplan-Meier-Überlebenskurve 1) unbehandelter, 2) mit 200 mM  $\text{NaHCO}_3$  behandelter sowie 3) behandelter und  $\text{NK1.1}^+$ -Zell-depletierter c-MYC-tragender Mäuse. Die Depletion erfolgte gemäß bestehenden Protokollen mittels Anti-Asialo-GM1-AK durch initial ein-, später zweiwöchige i.p.-Injektion. Der Depletionserfolg wurde regelmäßig durch periphere Blutentnahmen kontrolliert. (\*\*  $p \leq 0,01$ ; \*\*\*  $p \leq 0,001$ ).

### 3.5 NKZ-vermittelte Zytotoxizität

#### 3.5.1 Expression zytolytischer Peptide in NKZ

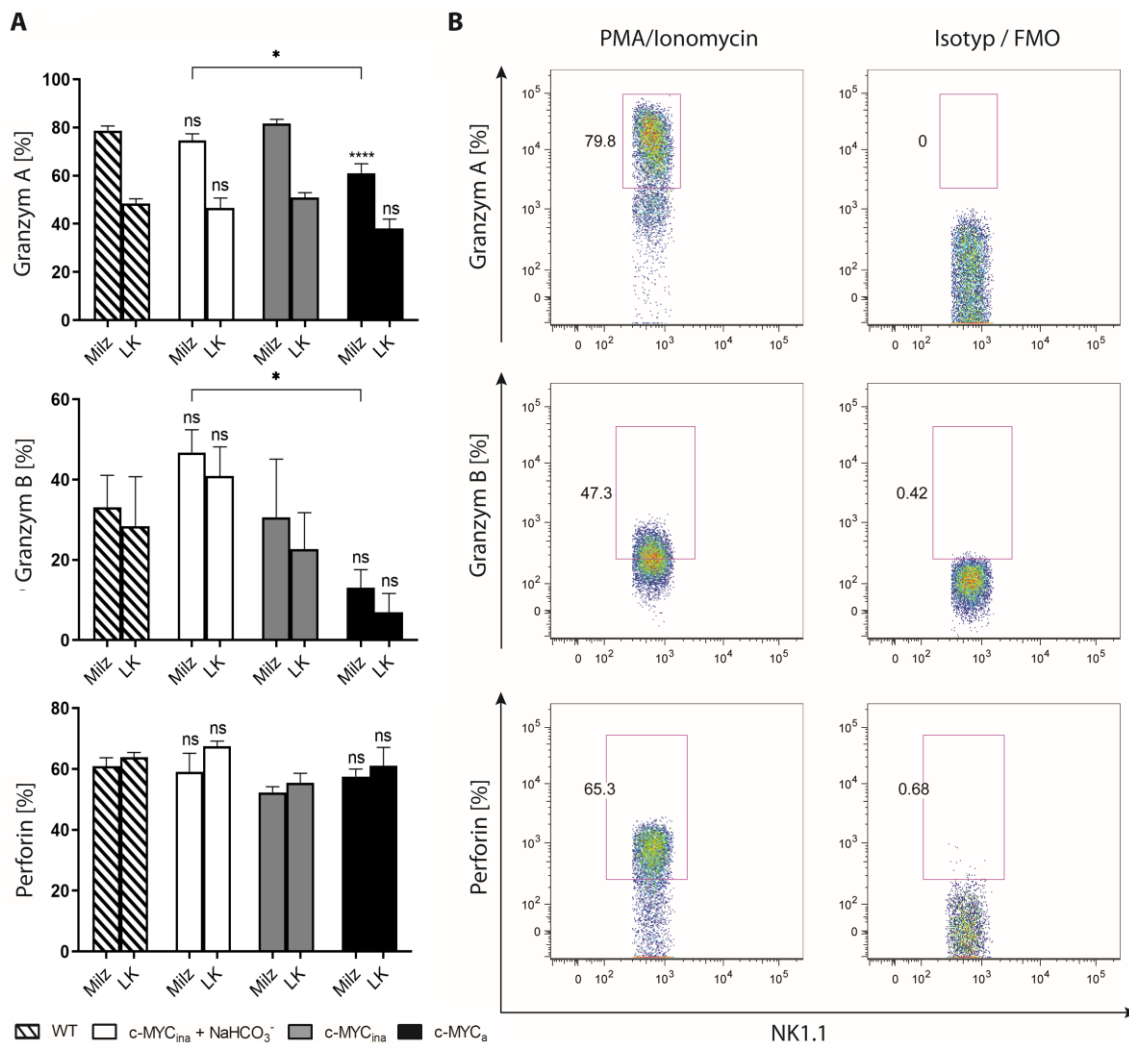
Um zu überprüfen, ob die Zytotoxizität ebenso wie die IFN- $\gamma$ -Expression (Pötzl *et al.*, 2017) durch Gabe von Natriumbikarbonat verbessert werden kann, wurden die zytolytischen Peptide der NKZ-Granula (Granzym A, Granzym B) sowie Perforin (Orange, 2008) *ex vivo* nach 4-stündiger PMA/Ionomycin-Stimulation durchflusszytometrisch gemessen (**Abb. 14**).

Für das quantitativ am häufigsten vorkommende Granzym A (Grz A) konnte kein verbesserter Füllungszustand in behandelten gegenüber unbehandelten Mäusen festgestellt werden, da auch NKZ aus unbehandelten c-MYC<sub>ina</sub> noch nicht durch das Tumormilieu beeinflusst zu sein schienen. Es zeigte sich lediglich in Milzen apparent kranker Mäuse ein signifikant defizitärer Füllungszustand ( $p \leq 0,01$ ; **Abb. 14A**).

Die Rekonstitution von Granzym B (Grz B) zeigte eine deutliche Verbesserung in mit Bikarbonat therapierten Milzen ( $p \leq 0,05$ ) sowie Lymphknoten ( $p \leq 0,01$ ) klinisch inapparenter Mäuse gegenüber unbehandelten, apparent kranken Mäusen. NKZ unbehandelter, inapparenter Versuchstiere konnten diesen Vorteil nicht aufweisen. Aufgrund teils hoher Varianz im Krankheitsstadium klinisch inapparenter Mäuse konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zur Therapiegruppe dargestellt werden, es zeigte sich jedoch eine konkordante Tendenz (**Abb. 14A**).

Perforin (*Prf*) entsprach in allen Versuchsgruppen dem WT-Wert. Es konnte keine Beeinflussung durch das Tumormilieu nachgewiesen werden (**Abb. 14A**).





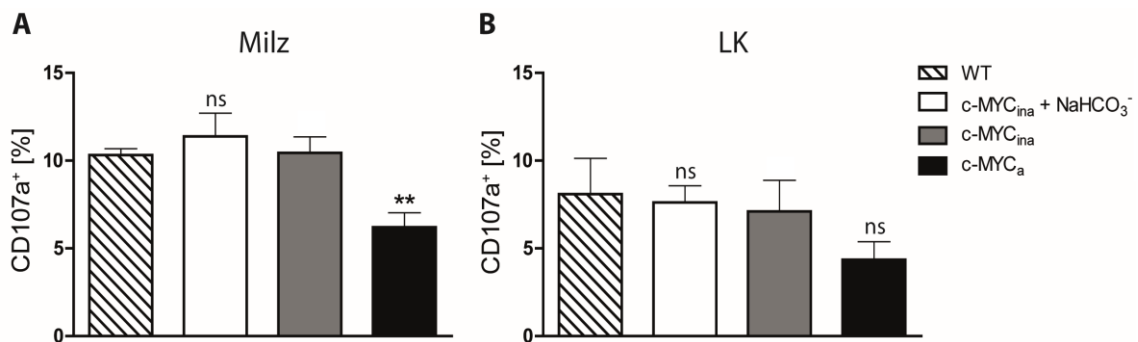
**Abb. 14:** Expression zytolytischer Peptide sowie von Perforin in NK1.1<sup>+</sup>-Zellen nach 4-stündiger Stimulation mit PMA/Ionomycin. **(A)** Darstellung der Ergebnisse als Säulendiagramm. Von li. n. re.: WT, c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub>, c-MYC<sub>ina</sub>, c-MYC<sub>a</sub>. Signifikanzen beziehen sich jeweils auf das entsprechende Organ der c-MYC<sub>ina</sub>-Werte (ns = nicht signifikant; \* p < 0,05; \*\*\*\* p < 0,0001; Mittelwerte aus n ≥ 5 Versuchen + SEM). **(B)** Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse der untersuchten Peptide mit jeweiligem Isotyp / FMO anhand von Milzen aus c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub>-Mäusen.

### 3.5.2 Degranulation intratumoraler NKZ ist nicht therapieabhängig

Desweiteren wurde nach Optimierung der Methode auch der Degranulationsmarker CD107a nach 5-stündiger Kokultur mit YAC-1-Zellen (1:1) unter Gabe von IL-15 auf NKZ gemessen. Dieser wird bei Sekretion der zytolytischen Peptide in Anwesenheit von MHC-I-defizienten Zielzellen auf der Zelloberfläche exprimiert und dient daher als Maß für die stattgefundenene Degranulation (Fukuda, 1991).

Hierbei zeigte sich in Milz sowie Lymphknoten eine signifikant verminderte Degranulation untersuchter NKZ aus apparent kranken c-MYC-Mäusen, jedoch keine

signifikante Differenz zwischen behandelten und unbehandelten inapparenten Mäusen (**Abb. 15**).

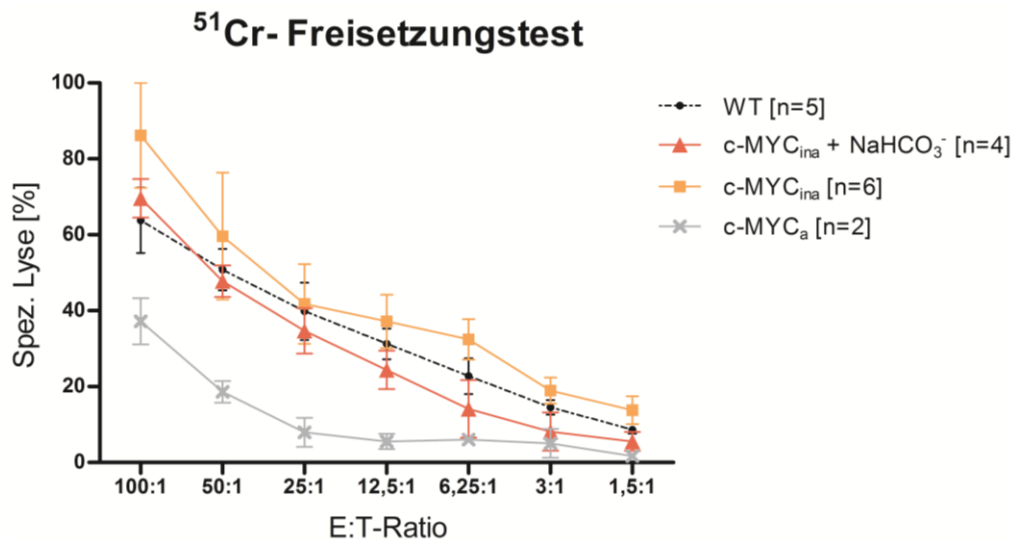


**Abb. 15:** Expression des Degranulationsmarkers CD107a nach 4-stündiger Koinkubation mit YAC-I-Zielzellen (1:1) auf NK1.1<sup>+</sup>-Zellen aus **(A)** Milz und **(B)** Lymphknoten. Signifikanzen (\*\*, ns) beziehen sich auf die c-MYC<sub>ina</sub>-Werte des jeweiligen Organs. (n≥4; \*\* p≤0,01; Darstellung als Mittelwert + SEM).

### 3.5.3 In-vitro Zytotoxizität intratumoraler NKZ ist nicht therapieabhängig

Als weiteres Maß für die Zytotoxizität wurden Chrom-[51]-Freisetzungstests durchgeführt, um die spezifische Lyse von NKZ gegenüber YAC-I-Zielzellen zu bestimmen (siehe „Material & Methoden“) (Sanderson, 1965; Brunner *et al.*, 1968).

Hierbei bestätigte sich, dass NKZ von mit NaHCO<sub>3</sub> behandelten Mäusen keine verbesserte Zytotoxizität gegenüber unbehandelten c-MYC<sub>ina</sub> aufweisen (**Abb. 16**). Der graphisch dargestellte Unterschied zu unbehandelten c-MYC<sub>ina</sub> ist nicht signifikant. Der Versuch verdeutlichte jedoch wie erwartet den vollständigen Verlust der funktionalen Zytotoxizität von unbehandelten NKZ in soliden Tumoren.

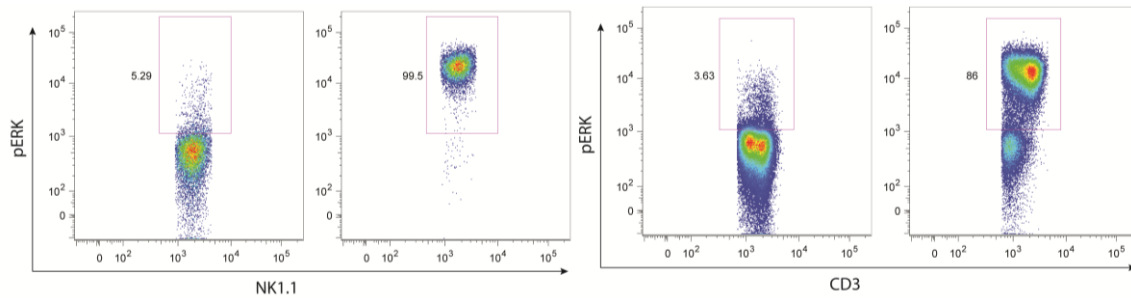


**Abb. 16:** Chrom-[51]-Freisetzungstest. NK1.1<sup>+</sup>-Zellen aus Milzen der Versuchsgruppen wurden isoliert und 4 h mit Chrom-[51]-beladenen YAC-I-Zielzellen koinkubiert. Anschließend wurde die spezifische Lyse anhand des Überstandes analysiert (Darstellung als Mittelwert ± SEM).

### 3.6 Molekulare Mechanismen des Funktionsverlustes

Die NKZ-vermittelte direkte Zytotoxizität konnte offenbar nicht durch orale Applikation von Bikarbonat gesteigert werden. Da jedoch die IFN- $\gamma$ -Expression erhöht war, und NKZ - wie anhand deren Depletion gezeigt werden konnte - eine Schlüsselrolle für das tumorfreie Überleben spielen, stellte sich die Frage, welche Mechanismen diesem Effekt auf molekularer Ebene zugrunde liegen.

Dafür wurde die Menge an phosphoryliertem Protein der für Degranulation und Zytokinexpression zuständigen Signalmoleküle der MAPK-Familie (*Mitogen-Activated Protein Kinase*: ERK, JNK, p38 (Dong, Davis and Flavell, 2002; Pisegna *et al.*, 2004; Jeffrey *et al.*, 2007) nach Stimulation mit PMA/Ionomycin durchflusszytometrisch in NK- und T-Zellen gemessen (**Abb. 17**).



**Abb. 17:** Exemplarische Darstellung von pERK<sup>+</sup> NK1.1<sup>+</sup>- sowie CD3<sup>+</sup>-Zellen vor (links) und nach (rechts) Stimulation mit PMA/I. Im *Dot-Plot* der CD3<sup>+</sup>-Zellen zeigen sich zwei unterschiedlich reagierende Populationen; hierbei könnte es sich um CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen handeln.

### 3.6.1 MAPK-Expression in NKZ

#### 3.6.1.1 NaHCO<sub>3</sub> stimuliert den pERK-Signalweg in NKZ

Therapierte c-MYC<sub>ina</sub> zeigten ein reduziertes Ausgangsniveau im Vergleich zum WT-Wert des jeweiligen Versuches (**Abb. 18A**). Dieses glied sich jedoch bereits 5 Minuten nach Stimulation aus und überstieg die Kontrollwerte um bis zu 10 %, um ab Minute 30 wieder dem WT zu entsprechen. Auch unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> wiesen vorstimulatorisch ähnlich reduzierte pERK-Werte auf. Sie ließen sich bereits 10 Minuten nach PMA/I-Stimulation auf die Kontrollwerte anheben, blieben damit jedoch deutlich hinter den Werten behandelter c-MYC<sub>ina</sub> zurück. Apparent kranke c-MYC<sub>a</sub> hingegen hatten ein erheblich reduziertes Ausgangsniveau (50 %). Auch durch Stimulation konnten die Aktivierung nur auf vorstimulatorische Werte der Vergleichsgruppen angehoben werden. Lediglich zu Minute 30 gleicht sich die Kurve kurzzeitig den WT-Werten an, da diese bereits wieder stark abgefallen waren. Der relative Anstieg der gemessenen Intensität pERK<sup>+</sup>-gefärbter Zellen ist bei c-MYC<sub>a</sub> stärker (maximal 42-fach) an als bei den Vergleichsgruppen (WT 35-fach; c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub> 32-fach; c-MYC<sub>ina</sub> 34-fach) (**Abb. 18C**). Dies ist zum Teil durch die unterschiedlichen Ausgangswerte zu erklären. Die alkalische Therapie konnte demnach eine positive Beeinflussung des pERK-Signalweges bewirken.

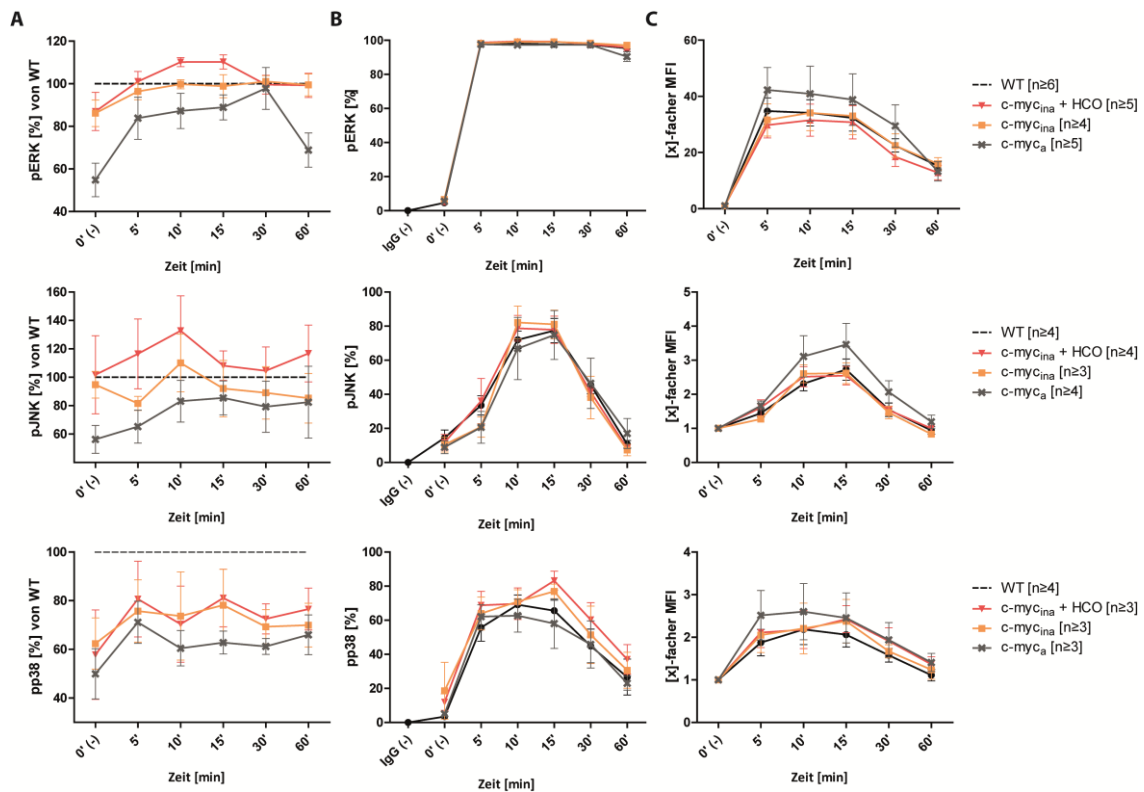
#### 3.6.1.2 NaHCO<sub>3</sub> stimuliert den pJNK-Signalweg in NKZ

Die NKZ-Aktivierung therapierter c-MYC<sub>ina</sub> entsprach zu Beginn des Versuches den Kontrollwerten, ließ sich jedoch durch Stimulation auf bis zu 130 % der WT-Werte anheben (**Abb. 18A**). Unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> entsprachen sowohl vor als nach

Stimulation der WT-Kontrolle und lagen daher deutlich unter den Werten behandelter c-MYC<sub>ina</sub>. c-MYC<sub>a</sub> hingegen waren bereits vor Stimulation stark beeinträchtigt (ca. 60 % der Kontrollwerte) und blieben auch im Verlauf ca. 20-40 % unterhalb des WT-Niveaus. Der relative Intensitätsanstieg an phosphoryliertem JNK (pJNK) der untersuchten Zellen zeigte sich auch hier, wie bei pERK, bedingt durch die Ausgangswerte stärker in apparent kranken c-MYC-Mäusen (**Abb. 18C**). Unter Therapie konnte demnach eine wesentlich stärkere (bis 40 %) absolute Aktivierung des JNK-Signalweges hervorgerufen werden als in der unbehandelten Kontrolle.

### **3.6.1.3 Der pp38-Signalweg in NKZ wird durch NaHCO<sub>3</sub> nicht beeinflusst**

Therapierte sowie unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> entsprachen bereits vor Stimulation etwa 60 % der WT-Kontrolle und ließen sich durch PMA/I nur auf maximal 80 % steigern (**Abb. 18A**). Es zeigte sich keine signifikante Differenz zwischen den beiden Gruppen. c-MYC<sub>a</sub> wiesen eine ähnliche Kinetik auf, lagen dabei jedoch vor Stimulation um ca. 10 %, nach Stimulation um ca. 10-20 % niedriger als ihre inapparenten c-MYC-tragenden Vergleichsgruppen. Der bereits beschriebene, relative Intensitätsanstieg apparent kranker c-MYC-Mäuse konnte auch hier beobachtet werden (**Abb. 18C**). Die systemische Bikarbonatgabe hatte demnach keine Auswirkungen auf den p38-Signalweg in NKZ.



**Abb. 18:** Analyse der phosphorylierten MAPK (pERK, pJNK, pp38) in NKZ. Vor bzw. bis 60 Minuten nach Stimulation wurden die Zellen zu genormten Zeitpunkten in ihrem Zustand fixiert, angefärbt und mittels FACS-Analyse untersucht. **(A)** Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) in Prozent der WT-Werte des jeweiligen Versuches. pERK betrug in c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub> vorstimulatorisch  $87 \pm 9$  %, stieg zu  $t = 10'$  auf  $110 \pm 3$  % an und fiel ab  $t = 30'$  wieder auf WT-Werte ab. pJNK betrug in c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub> vorstimulatorisch  $102 \pm 27$  %, stieg zu  $t = 10'$  auf  $133 \pm 25$  % an und blieb bis zu Versuchsende über den Werten unbehandelter c-MYC<sub>ina</sub>. p38 betrug in c-MYC<sub>ina</sub> + NaHCO<sub>3</sub> vorstimulatorisch  $58 \pm 18$  % und ließ sich maximal auf  $81 \pm 12$  % ( $t = 5'$ ) steigern. **(B)** Anzahl derjenigen NKZ in Prozent, die durch Stimulation eine detektierbare Phosphorylierung der jeweiligen MAPK aufzeigten. **(C)** Relativer MFI-Anstieg bezogen auf den unstimulierten Ausgangswert. (Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM)

Wie in **Abb. 18B** dargestellt, konnte eine erfolgreiche Stimulation von  $\geq 80$  % der NKZ in allen untersuchten Signalwegen erzielt werden.

### 3.6.2 MAPK-Expression in T-Zellen

Bei der Analyse von CD3<sup>+</sup>-Zellen zeigten sich überraschenderweise Hinweise auf ein unterschiedliches Verhalten zweier CD3<sup>+</sup>-Populationen hinsichtlich ihrer MAPK-Signalkaskaden (wie exemplarisch in **Abb. 17** erkennbar), wodurch die Interpretation der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich ist. Dieser Unterteilung sollte in zukünftigen Untersuchungen nachgegangen werden.

### 3.6.2.1 pERK in T-Zellen

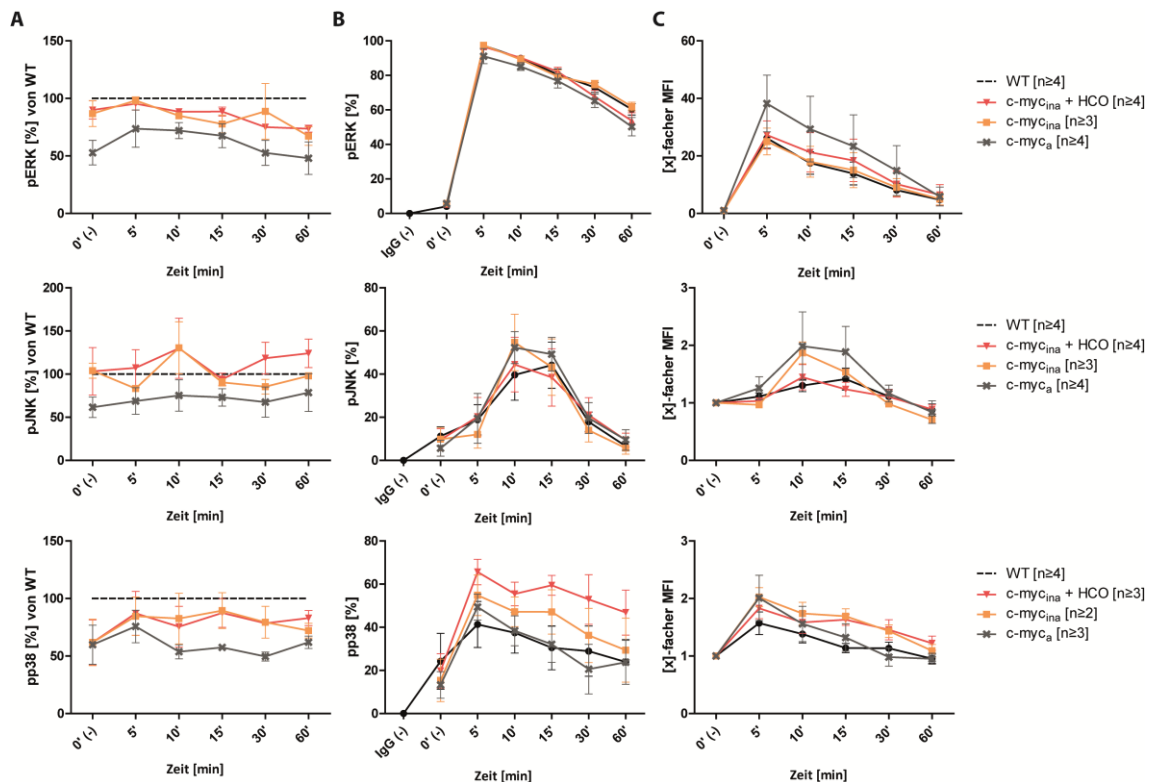
Behandelte sowie unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> entsprachen im Ausgangsniveau annähernd der WT-Kontrolle, sanken jedoch nach Stimulation im Verlauf um bis zu 30 % unter dessen Werte ab. c-MYC<sub>a</sub> hingegen wiesen vor Stimulation nur 50 % der WT-Kontrolle auf und blieben nach einem kurzen Anstieg weiterhin ca. 20-30 % hinter den inapparenten Kontrollen zurück (**Abb. 19A**). Die Therapie zeigte in dem beschriebenen Versuchsaufbau keine Effekte auf den ERK-Signalweg der CD3<sup>+</sup>-Gesamtpopulation, jedoch schien das Krankheitsstadium einen Einfluss sowohl auf das basale Aktivierungsniveau sowie das Ausmaß der Stimulierbarkeit zu haben.

### 3.6.2.2 pJNK in T-Zellen

Auch bei pJNK verhielten sich behandelte sowie unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> nahezu identisch und unterschieden sich kaum von der WT-Kontrolle. c-MYC<sub>a</sub> hingegen wiesen auch hier reduzierte Ausgangswerte mit etwa 60 % der WT-Kontrolle auf und ließen sich durch Stimulation kaum beeinflussen. (**Abb. 19A**) Dies steht im Kontrast zu experimentellen Untersuchungen in humanen T-Zellen (Mendler, *et al.* 2012) und ist hierbei vermutlich auf die fehlende, weitere (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-) Differenzierung zurückzuführen. Auch hier konnte eine Abhängigkeit vom Krankheitsstadium festgestellt werden.

### 3.6.2.3 pp38 in T-Zellen

Die Ausgangswerte aller untersuchten Gruppen entsprachen nur etwa 60 % der WT-Kontrolle. Ab 5 Minuten nach Stimulation stiegen behandelte sowie unbehandelte c-MYC<sub>ina</sub> jedoch auf ca. 90 % an, c-MYC<sub>a</sub> hingegen verblieb auf ca. 50 % der WT-Kontrolle (**Abb. 19A**). Es zeigte sich eine deutlich höhere Aktivierung des p38-Signalweges nicht in der Intensität – sondern der Anzahl aktivierter CD3<sup>+</sup>-T-Zellen (**Abb. 19B**).



**Abb. 19:** Analyse der phosphorylierten MAPK (pERK, pJNK, pp38) in T-Zellen (Auswertung Analog zu Abb. 18). **(A)** Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) in Prozent der WT-Werte des jeweiligen Versuchs. **(B)** Anzahl derjenigen NKZ in Prozent, die durch Stimulation eine detektierbare Phosphorylierung der jeweiligen MAPK aufzeigten. **(C)** Relativer MFI-Anstieg bezogen auf den unstimulierten Ausgangswert. (Darstellung als Mittelwert  $\pm$  SEM)

Wie in **Abb. 19B** dargestellt, konnte eine erfolgreiche Stimulation von  $\geq 60\%$  NKZ in allen untersuchten Signalwegen erzielt werden.

### 3.7 IFN- $\gamma$ -Expression unter adoptivem NKZ-Transfer therapieabhängig erhöht

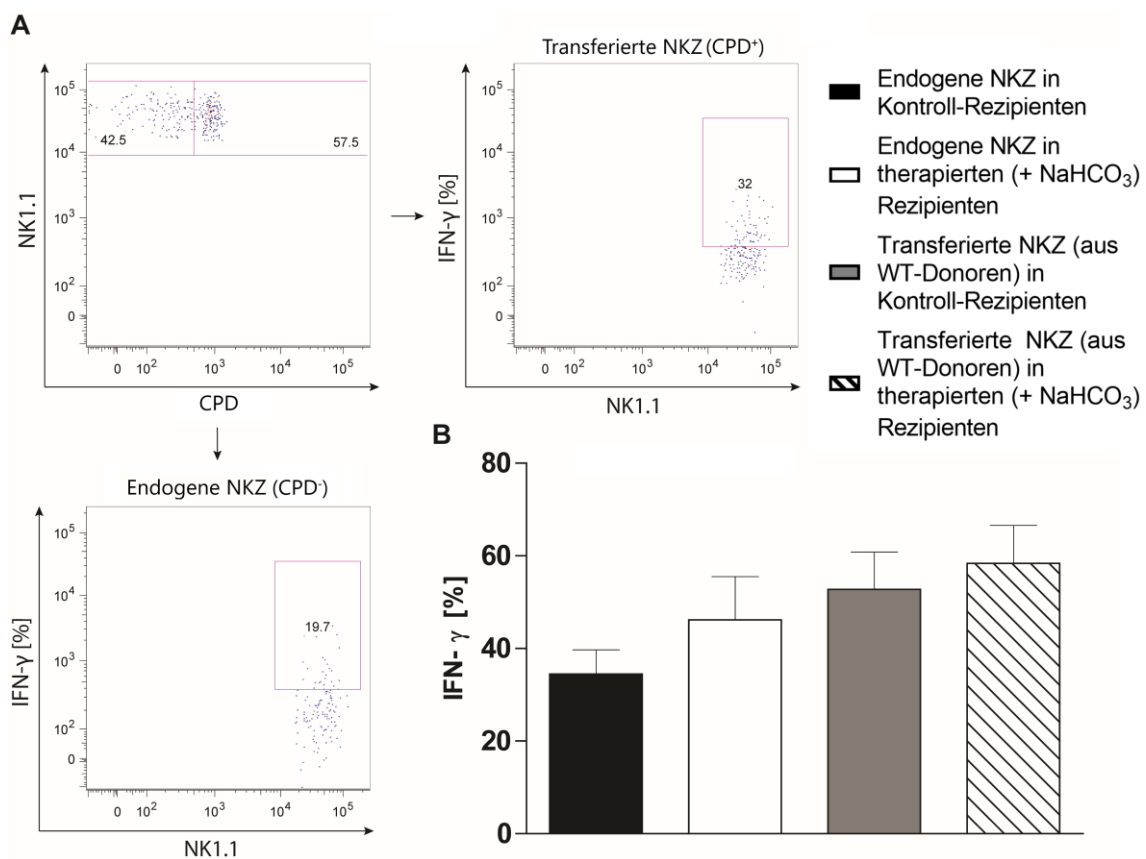
Um zu untersuchen, wie sich der durch Bikarbonattherapie gesteigerte pH-Wert auf die NKZ-Funktion auswirkt und ob die Immuninhibition auch unter adoptivem NKZ-Transfer durch systemische Alkalisierung verhindert werden kann, wurde ein transplantierbares c-MYC-Modell verwendet (Details siehe „*Material und Methoden*“). Dafür wurden WT-Mäuse mit Bikarbonat-versetztem Trinkwasser gefüttert und erhielten anschließend eine subkutane Injektion von 291-Zellen. Die 291-Zellkulturlinie entspricht den malignen B-Zellen des c-MYC-Lymphoms. Sobald der Tumor angewachsen war, wurden aus einer weiteren Kohorte unbehandelter WT-Mäuse NKZ isoliert, markiert und den Versuchstieren intratumoral appliziert. 24 Stunden später erfolgte die FACS-Analyse



aller intratumoralen NKZ auf ihre IFN- $\gamma$ -Expression. Als Kontrolle diente eine unbehandelte WT-Kohorte, die derselben Prozedur unterzogen wurde.

Transferierte NKZ in unbehandelten Kontroll-WT-Mäusen wiesen dabei mit durchschnittlich ca. 50 % erwartungsgemäß eine grundsätzlich höhere IFN- $\gamma$ -Expression auf als die endogenen NKZ des angewachsenen Tumors (30 %) (**Abb. 20B**). Die systemische Bikarbonatgabe in Empfänger-mäusen führte jedoch mit ca. 60 bzw. 40 % sowohl in transferierten als auch endogenen NKZ zu einer deutlich stärkeren IFN- $\gamma$ -Expression und bestätigte damit die Hypothese des supportiven Effektes von Natriumbikarbonat.

Für eine höhere Trennschärfe wird eine größere Probenanzahl benötigt.

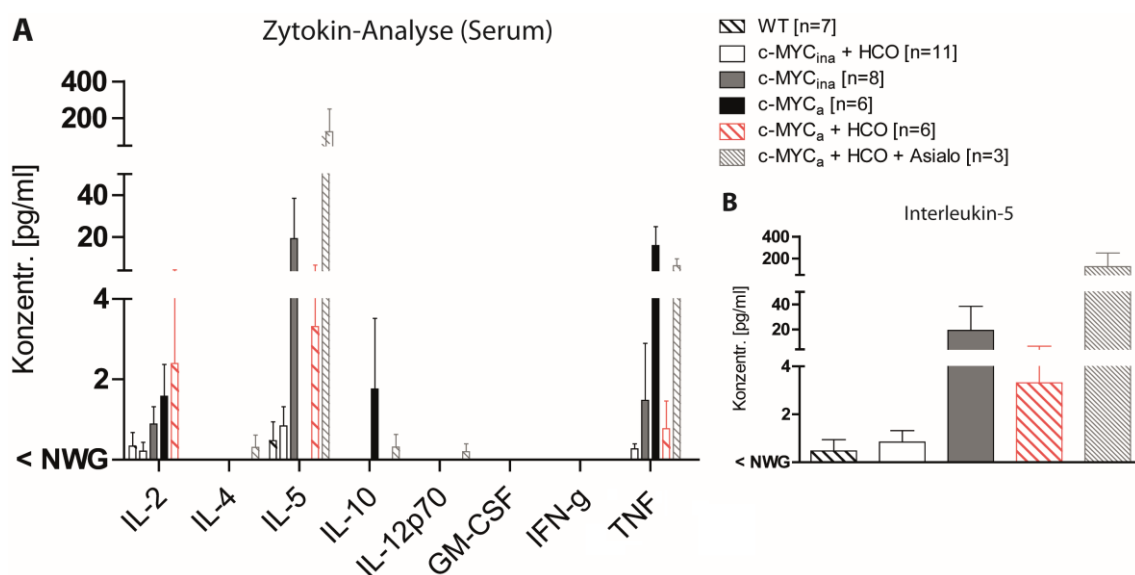


**Abb. 20:** IFN- $\gamma$ -Expression transferierter sowie endogener intratumoraler NK1.1<sup>+</sup>-Zellen. Nach Anwachsen der Tumorlast von  $10^7$  291-Zellen (s.c. in beide Flanken,  $\geq 8$ mm) in Kontrollen vs. therapierten (+ NaHCO<sub>3</sub>) WT-Mäusen wurden  $1 \times 10^6$  fluoreszenzmarkierte (CPD<sup>+</sup>) NKZ aus weiteren, unbehandelten WT-Donoren intratumoral appliziert. 24h später erfolgte die Entnahme, Trennung endogener und transferierter NKZ anhand eines Proliferationsfarbstoffes und Analyse der IFN- $\gamma$ -Expression. **[A]** Exemplarische Darstellung der entnommenen Zellen anhand eines Tumors der nicht-alkalisierten Kontrollgruppe. **[B]** Vergleich der IFN- $\gamma$ -Expression anhand eines Säulendiagrammes. Endogen:  $33 \pm 3$  %;

Endogen + NaHCO<sub>3</sub>: 43 ± 6 %; Transferiert: 53 ± 6 %; Transferiert + NaHCO<sub>3</sub>: 58 ± 6 % (n≥6; Darstellung und Angaben als Mittelwert + SEM)

### 3.8 Zytokinmilieu: Therapie führt zu Th1-Differenzierung

Um die Hypothese zu überprüfen, ob die erhöhte IFN- $\gamma$ -Expression in NKZ alkalisierter Mäuse eine verstärkte Th1-Antwort hervorruft, wurde eine Untersuchung des hämatologischen Zytokinmilieus mittels Multi-Bioplex durchgeführt. Die Analyse von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und TNF zeigte dabei eine gegensätzliche Therapie- und NKZ-abhängige Expression von IL-5 sowie TNF (**Abb. 21A**).



**Abb. 21:** Analyse von IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, GM-CSF, IFN- $\gamma$  und TNF mittels Multiplex-Assay. Den untersuchten Versuchstieren wurde Blut entnommen, dieses anschließend abzentrifugiert und bis zur Verwendung bei -20 °C eingefroren. **(A)** Ergebnisse als Säulendiagramm. **(B)** Vergrößerung von IL-5 aus (A); c-MYCa nicht dargestellt, da unterhalb der NWG. **IL-5:** c-MYCa + NaHCO<sub>3</sub>: 0,9 pg/ml; c-MYCa: 19 pg/ml; c-MYCa + NaHCO<sub>3</sub>: 3 pg/ml; c-MYCa + NaHCO<sub>3</sub> + Asialo: 126 pg/ml. **TNF:** c-MYCa + NaHCO<sub>3</sub>: 0,3 pg/ml; c-MYCa: 1,5 pg/ml; c-MYCa + NaHCO<sub>3</sub>: 0,8 pg/ml; c-MYCa + NaHCO<sub>3</sub> + Asialo: 6,4 pg/ml (Darstellung als Mittelwert + SEM; <NWG = unterhalb der Nachweisgrenze)

IL-5 war in Seren inapparenter c-MYC-Mäuse unter Therapie niedriger als in der unbehandelten Kontrollgruppe; mit Übergang in das klinisch-apparente Stadium steigt der Wert unter Therapie, bleibt damit jedoch weiterhin unterhalb den Werten unbehandelter c-MYCa. Unter vollständiger NKZ-Depletion zeigten sich trotz Therapie die höchsten IL-5-Spiegel (**Abb. 21B**). Die Analyse von TNF wies ein ähnliches Verteilungsmuster zu IL-5 auf. Sowohl c-MYCa als auch c-MYCa zeigten unter Therapie

geringere Mengen TNF als ihre unbehandelten Kontrollen. Auch hier waren unter NKZ-Depletion in behandelten c-MYC<sub>a</sub> überraschend hohe Werte nachweisbar (**Abb. 21A**).

Die Mengen an IL-4, IL-10, IL-12p70, GM-CSF sowie IFN- $\gamma$  im Serum blieben in diesem Versuchsansatz größtenteils unterhalb der Nachweisgrenze, sodass hierzu keine Aussage getroffen werden kann. IL-2 deutete auf keine signifikanten Unterschiede hin. Der Versuch weist auf eine Th1-Differenzierung unter Therapie hin, welche im klinisch-apparenten Stadium stark von der Anwesenheit von NKZ abhängig zu sein scheint. Da die Expression von IL-5 unter NKZ-Depletion deutlich höher ist als in der entsprechenden Vergleichsgruppe, muss von einem immunologisch günstigen, NKZ-vermittelten Effekt in apparent kranken Mäusen unter Therapie ausgegangen werden.

## 4 DISKUSSION

---

Die ubiquitär in soliden Tumoren vorkommende Laktatazidose ist eine der essenziellen Mechanismen, die für die Suppression einer effektiven Antitumorantwort verantwortlich gemacht werden, und rückt daher seit Jahren immer weiter in den Vordergrund der Forschung. Die Laktatakkumulation und der stark erniedrigte extrazelluläre pH ( $\text{pH}_e$ ) des Tumormikromilieus korrelieren dabei mit einer höheren Mutationsrate, einer ungünstigeren Prognose, einer höheren Metastaseninzidenz sowie Strahlen- und Chemotherapieresistenz (Röttinger and Mendonca, 1982; Walenta *et al.*, 2000; Raghunand *et al.*, 2001). Die vermittelnden Mechanismen sind zum Teil bislang ungeklärt, es konnte jedoch für mehrere Tumoren *in vivo* gezeigt werden, dass eine Erhöhung des  $\text{pH}_e$  das Tumorwachstum signifikant verzögern kann. (Robey *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; Pilon-Thomas *et al.*, 2016). Dafür hat sich die Gabe von systemischen Puffern, wie etwa mit  $\text{NaHCO}_3$  versetztem Trinkwasser etabliert - eine sehr simple und nebenwirkungsarme Intervention. Der intratumorale pH wird dabei hin zu neutraleren Werten verschoben, ohne dabei den systemischen pH zu beeinflussen, man spricht von einer „metabolisch kompensierten Alkalose“ (Silva *et al.*, 2009). Errechnet man aus der in unserem Mausmodell verwendeten Konzentration von 200 mM Natriumbikarbonat, der durchschnittlichen Trinkmenge (ca. 3 ml) und dem durchschnittlichen Gewicht von C57BL/6-Mäusen (ca. 25 g) die durchschnittliche Natriumbikarbonat-aufnahme (ca. 32 mmol/kgKG/d bzw. ca. 2,67 g/kgKG/d), entspricht dies bei einem 70 kg schweren Menschen durchaus realisierbaren Werten (ca. 187 g/d).

Die durch eine Vielzahl an Mechanismen verursachte Laktatazidose inhibiert die Zellen einer effektiven Antitumorantwort, wie etwa T-Zellen und dendritische Zellen, in ihrer Funktion (Mendler *et al.*, 2012; Vivar *et al.*, 2013; Fischer *et al.*, 2015). Auch für NKZ ist dieser Effekt beschrieben (Loeffler, Heppner and Juneau, 1991), die zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt.

Ziel der Arbeit war es, in einem endogen wachsenden Lymphommodell durch orale Bikarbonattherapie die immunsuppressive Tumoraazidose zu neutralisieren und die Auswirkungen, insbesondere auf NKZ, zu untersuchen. Sollte sich eine verbesserte

Tumorantwort zeigen, was zu überprüfen: 1) ob dieser Effekt auf NKZ zurückzuführen ist, 2) inwieweit die Effektorfunktion der NKZ dadurch beeinflusst wird und 3) welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich gemacht werden können.

#### **4.1 Orale Bikarbonatgabe verstärkt NKZ-Migration und führt zu effektiver Antitumorantwort**

##### **4.1.1 200 mM NaHCO<sub>3</sub> p.o. führt zu NKZ-abhängigem Überlebensvorteil im endogenen $\lambda$ -Myc-Modell**

Wie in **Abb. 13** dargestellt, zeigte sich in c-MYC-tragenden Mäusen unter oraler Applikation von NaHCO<sub>3</sub> ein hochsignifikanter Überlebensvorteil ( $p < 0,001$ ); es erfolgte keine weitere Intervention. Dieser Vorteil war durch NKZ bedingt, wie anhand einer Kontrollgruppe mit NKZ-depletierten Mäusen gezeigt werden konnte. Die Effektivität der Depletion wurde in regelmäßigen Abständen im Blut kontrolliert, um eine Bildung von Anti-Antikörpern auszuschließen (**Abb. 5**).

Der verwendete Antikörper richtet sich gegen das Glykolipid „asialo ganglio-N-tetraosylceramid“ (Asialo-GM-1), welches seit vielen Jahren effizient zur Depletion von NKZ eingesetzt wird (Kasai *et al.*, 1981). Jedoch kommt Asialo-GM1 nicht ausschließlich auf NKZ, sondern zum Teil auch auf einer Subpopulation von NKT-, CD8<sup>+</sup>-T-, und  $\gamma\delta$ -T-Zellen (Lee *et al.*, 1996; Trambley *et al.*, 1999), basophilen Leukozyten (Hideto *et al.*, 2011) und weiteren Immunzellen unter experimentellen Bedingungen vor. Es könnten daher auch weitere Faktoren in den beobachteten Überlebensvorteil eingehen, deren Betrachtung sich uns entzieht. In Anbetracht der zentralen Rolle von NKZ in der Tumorkontrolle ist jedoch davon auszugehen, dass der Effekt im großen Ausmaß hierdurch bedingt ist.

Im Einklang damit fiel bei der Untersuchung der tumorbefallenen Organe - Milz und Lymphknoten - auf, dass unter Therapie eine signifikant höhere Anzahl NK1.1<sup>+</sup>-Zellen in den Milzen (**Abb. 10-A**), nicht jedoch in den Lymphknoten (**Abb. 10-B**) nachweisbar waren. In vielen Tumoren, wie etwa dem Magen-, Kolorektal- oder Lungenkarzinom wurde eine höhere Anzahl von NKZ als prognostisch günstig beschrieben (Coca *et al.*, 1997; Ishigami *et al.*, 2000; Takanami, Takeuchi and Giga, 2001; Villegas *et al.*, 2002). Dies ist vermutlich durch die vielfältigen direkten sowie immunregulatorischen

Funktionen von NKZ bei der körpereigenen Tumorabwehr bedingt, die bereits während früher Krankheitsstadien effektiv werden (Dunn *et al.*, 2007).

#### 4.1.2 NK-Zellen migrieren chemotaktisch in endogene Tumoren

Da jedoch unklar war, wie es zu diesem Zellzahlanstieg kam, versuchten wir zu differenzieren, ob die NKZ lokal proliferieren oder aus anderen Kompartimenten eingewandert sind. Wie bereits gezeigt werden konnte, ist der CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3 (CXCR3/CD183) essenziell für die *in vivo* stattfindende Chemotaxis von NKZ in Tumoren (Hayakawa *et al.*, 2006; Wendel *et al.*, 2008; Groom and Luster, 2011; Groom *et al.*, 2012; Przewoznik *et al.*, 2012). Die dadurch entstehende Migration von NKZ korreliert mit stärkerer Tumorregression sowie längerer medianer Überlebenszeit (Wennerberg *et al.*, 2014). CXCR3 wird sowohl auf NKZ als auch auf T-Zellen exprimiert und bindet die Chemokine CXCL-9 (MIG), CXCL-10 (IP-10) und CXCL-11 (I-TAC). Die hier verwendeten C57BL/6-Mäuse sind natürliche Nullmutanten für CXCL-11 (Sierro *et al.*, 2007). Durch Interaktion mit seinen Liganden wird CXCR3 internalisiert (Sauty *et al.*, 2001) und dient als Maß für die stattgefundene Migration. Wie in **Abb. 12A** dargestellt, weisen NKZ aus Milzen untersuchter Mäuse unter Therapie eine signifikant geringere Oberflächenexpression an CXCR3 auf - ein eindeutiges Indiz für die gesteigerte Immuninfiltration. Dieser Effekt konnte in Lymphknoten nicht beobachtet werden. Im Endstadium der apparent kranken c-MYC<sub>a</sub> hingegen ließ die Migration von NKZ ohne Therapie sogar nach, was im Kontrast zu bisherigen Untersuchungen steht (Przewoznik *et al.*, 2012). Die Expression der Liganden scheinen dabei die Tumorzellen des endogenen B-Zell-Lymphoms selbst zu übernehmen (Przewoznik *et al.*, 2012), wobei auch weitere Quellen, wie etwa nichttumorale Leukozytenfraktionen, diskutiert werden (Wendel *et al.*, 2008). IFN- $\gamma$  spielt eine zentrale Rolle in der Induktion von CXCL-9 und CXCL-10; die vorrangigen IFN- $\gamma$ -Produzenten (NKZ) verlieren diese Funktion im klinisch apparenten Krankheitsstadium des hier verwendeten  $\lambda$ -myc-Lymphoms ohne Intervention jedoch vollständig (Brenner *et al.*, 2010). CXCL-9 und -10 werden in späten Krankheitsstadien auch IFN- $\gamma$ -unabhängig exprimiert (Przewoznik *et al.*, 2012), dies reicht jedoch nicht aus, um die stärkere Migration im Vergleich zu unbehandelten c-MYC<sub>ina</sub>-Mäusen zu erklären. Da die IFN- $\gamma$ -Expression in intratumoralen NKZ durch

systemische Alkalisierung nachweislich gesteigert werden konnte (Pötzl *et al.*, 2017), könnte dies jedoch ein zusätzlicher Stimulus zur Sekretion von CXCL-9 und CXCL-10 sein. Wald *et al.* deuteten zudem auf eine strikte Abhängigkeit der NKZ-Migration von CD3<sup>+</sup>-Zellen (T-Zellen) hin. Bei Applikation von IFN- $\gamma$  in SCID-Mäusen (B- und T-Zell-defizient) bzw. C57BL/6-Mäusen mit CD3<sup>+</sup>-Depletion zeigte sich ein vollständiges Sistieren der NKZ-Migration aus Knochenmark und Milz, welche jedoch durch adoptiven Transfer von CD3<sup>+</sup>-T-Zellen wiederhergestellt werden konnte (Wald *et al.*, 2006). Die Interaktion dieser beiden Zellpopulationen hinsichtlich des Migrationsverhaltens bedarf weiterer Forschung.

Die Untersuchung des Proliferationsmarkers Ki-67 (**Abb. 11**) unterstützt die These der chemotaktisch migrierenden NK-Zellen in das Tumorgewebe, da hierbei eine lokale Proliferation sowohl in Milz als auch in Lymphknoten behandelter sowie unbehandelter als unwahrscheinlich angesehen werden konnte.

## **4.2 Mechanismen der gesteigerten Effektorfunktion intratumoraler NKZ**

NKZ kommt sowohl in der Immunüberwachung als auch in der direkten Antitumorantwort eine zentrale Rolle zu, und sie sind in der Lage, ohne vorherige Konditionierung direkte Zytotoxizität auf Tumorzellen auszuüben. Der über eine Balance von aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren regulierte Mechanismus führt entweder zur Aktivierung des Granzym-Perforin- oder Todesrezeptor-Signalweges. In der Tumorkontrolle sind dabei vor allem Perforin sowie Granzym B von entscheidender Bedeutung (van den Broek *et al.*, 1995, 1996; Smyth *et al.*, 2000). NKZ stellen daher einen attraktiven Angriffspunkt für Therapieoptionen in der Tumorummunologie dar.

### **4.2.1 Unveränderte Zytotoxizität trotz Steigerung des zytotoxischen Potenzials**

Durch 4-stündige PMA/Ionomycin-Stimulation wurde die Syntheseleistung der beschriebenen Peptide *ex vivo* entnommener NKZ untersucht. Dabei zeigte sich vor allem bei Granzym B, dem effektivsten zytolytischen Peptid, sowohl in Milz als auch Lymphknoten eine stärkere Expression unter Therapie (**Abb. 14**). Granzym B ist in der Lage, in Zielzellen innerhalb von 5-8 Minuten die Apoptose auszulösen, und *GrzB*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen nur etwa 40 % ihrer physiologischen Lysekapazität (Voskoboinik, Whisstock and Trapani, 2015). Granzym A sowie Perforin wiesen im untersuchten,

klinisch inapparenten Krankheitsstadium auch ohne Therapie keine (*GrzA*) bzw. nur geringe (*Prf*) Defizite auf, daher lässt sich zu den Therapieeffekten diesbezüglich keine definitive Aussage treffen (**Abb. 14**). Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass sich die Neutralisierung der Tumorazidose zumindest für Granzym A in späteren Krankheitsstadien ebenfalls vorteilhaft auswirkt, da Granzym A und B sehr ähnliche Synthesewege aufweisen (Griffiths and Isaaz, 1993; Pham and Ley, 1999). Die Aktivität von Perforin ist zum Schutz der eigenen Zelle stark pH- sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig (Voskoboinik *et al.*, 2005; Praper *et al.*, 2010). Es wäre also denkbar, dass Tumoren, zusätzlich zu den bekannten Abwehrmechanismen wie der Überexpression von Bcl-2, Bcl-xL oder weiteren antiapoptotischen Signalmolekülen (Sutton, Vaux and Trapani, 1997; Kumar, Reusch and Ladilov, 2008; Ryder *et al.*, 2012) auch das saure, extrazelluläre Milieu nutzen, um sich gegenüber NK- und T-Zell-vermittelter Zytotoxizität zu schützen. Es verwundert daher, dass aus den entsprechenden Versuchstieren isolierte NKZ bei Koinkubation mit MHC-I-defizienten YAC-I-Zielzellen unter Therapie keine korrelierende, gesteigerte Effektorfunktion zeigten (**Abb. 16**). Ebenfalls konnte anhand des Lysosomen-assoziierten Membranproteins 1 (LAMP1 / CD107a) während Koinkubation mit YAC-I-Zielzellen unter Therapie keine gesteigerte Degranulation festgestellt werden (**Abb. 15**). Auch hier gilt zu beachten, dass die Degranulationsfähigkeit im klinisch inapparenten Krankheitsstadium (*c-MYC<sub>ina</sub>*) nicht signifikant eingeschränkt war, die Werte also sowohl in Milz als auch im Lymphknoten in beiden inapparenten Gruppen dem WT-Wert entsprachen.

Die Versuche konnten zusammenfassend zeigen, dass NKZ für das tumorfreie Überleben eine zentrale Rolle spielen und das höhere, mediane Überleben auf diese zurückgeführt werden kann. Dies scheint jedoch nicht durch eine effektive, direkte Tumorantwort bedingt zu sein, da sich, abgesehen von der gesteigerten Granzym-B-Expression, kein entsprechendes Korrelat der Zytotoxizität finden ließ. Dies ist zum Teil auch der starken Variabilität des klinisch inapparenten Krankheitsstadiums (*c-MYC<sub>ina</sub>*) geschuldet, da sich in vielen Mäusen zum Zeitpunkt der Untersuchung keine Defizite in der Effektorfunktion finden ließen, hingegen diese im klinisch apparenten Stadium (*c-MYC<sub>a</sub>*) sehr eindrücklich waren (**Abb. 14 – 16**).



#### 4.2.2 Mediatoren der pH-vermittelten Funktionssteigerung: ERK und JNK

Da unter Therapie eine gesteigerte Expression des zentralen Signalmoleküls IFN- $\gamma$  beobachtet werden konnte, versuchten wir zu eruieren, welche molekularen Mechanismen auf Ebene der Signaltransduktion für die alterierte Immunantwort verantwortlich gemacht werden könnten.

Hierfür wurden die für die Zytotoxizität und Zytokinexpression verantwortlichen *mitogen-activated-protein-kinases* (MAPK) in NK- und T-Zellen untersucht. MAPK sind ubiquitär vorkommende Serin-Threonin-Kinasen, die durch Phosphorylierung ihres Thr-X-Tyr-Motivs in der regulatorischen Domäne Signale des Zellwachstums und der Differenzierung vermitteln (Su and Karin, 1996; Robinson and Cobb, 1997).

ERK 1/2 (*Extracellular Signal-Related Kinase*) wird in NKZ durch Bindung an Zielzellen bzw. Fc $\gamma$ R11A-Stimulation aktiviert und ist verantwortlich für die Expression proinflammatorischer Zytokine, spontane Zytotoxizität, antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) und Fc $\gamma$ R-vermittelte Degranulation (Trotta, Kanakaraj and Perussia, 1996; Milella *et al.*, 1997; Trotta *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 1998). p38 wurden in NKZ sehr ähnliche Funktionen wie ERK zugeschrieben (Zytokin-Expression, spontane Zytotoxizität, ADCC) (Wysk *et al.*, 1999; Trotta *et al.*, 2000; Pisegna *et al.*, 2004).

JNK/SAPK (*c-Jun N-Terminal Kinase / Stress-Activated Protein Kinase*) hingegen spielt keine exklusive Rolle in der spontanen Zytotoxizität oder ADCC, hat jedoch eine Bedeutung in der Expression proinflammatorischer Zytokine (IFN- $\gamma$ , TNF), indem es über c-Jun zusammen mit dem von p38 aktivierten c-Fos den transkriptionellen Aktivator Komplex 1 (AP-1) bildet (Su and Karin, 1996; Bernard *et al.*, 1999; Rincón and Davis, 2009).

Sowohl mit als auch ohne Therapie betrug der vorstimulatorische Wert von pERK<sup>+</sup>-NKZ *ex vivo* nur etwa 85 % der WT-Kontrolle (**Abb. 18**). Behandelte c-MYC<sub>ina</sub> zeigten 10 Minuten ab Stimulation jedoch eine supramaximale Aktivierbarkeit auf bis zu 110 % der WT-Kontrolle, während NKZ unbehandelter Mäuse dieses Potenzial nicht aufweisen konnten. Ähnliches konnte bei der Analyse von pJNK beobachtet werden. Dieses Signalmolekül war *ex vivo* weder mit noch ohne Therapie reduziert, jedoch unterschied sich die Kinetik im Verlauf erheblich. Bereits 5 Minuten post Stimulation wurde JNK

behandelter NKZ mit ca. 120 % signifikant stärker phosphoryliert / aktiviert als in der unbehandelten Kontrollgruppe (ca. 80 %) und stieg um Minute 10 sogar auf Werte von über 130 % der WT-Kontrolle an. Für p38 konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden. Unbehandelte, klinisch apparente c-MYC<sub>a</sub> zeigten in allen drei MAPK eine erhebliche Inhibition von bis zu 50 % der WT-Kontrolle. Dies ist das erste Mal, dass NKZ ex vivo hinsichtlich ihres Phosphorylierungsstatus der Effektor-Signalkaskade untersucht wurden.

Trotz der deutlichen Funktionsverbesserung des *ERK-MAPK*-Signalweges unter Therapie scheinen die inhibierenden Faktoren der tumoralen Immunresilienz ausreichend zu sein, eine Steigerung der effektiven, direkten Antitumorantwort wie der zytotoxischen Degranulation zu unterdrücken. Dies würde erklären, warum das höhere zytotoxische Potenzial (vor allem *GrzB*, sowie ausreichende Mengen *GrzA* und *Prf*) keine korrelierende höhere Lysefähigkeit zur Folge hatte. Daher ist anzunehmen, dass der intensivierte *ERK 1/2*-Signalweg lediglich in seiner Steigerung der Zytokinexpression, insbesondere der von IFN- $\gamma$ , zu Tragen kommt. Diese partielle Inhibition bedarf weiterer Untersuchungen. Somit sollte vor allem die signifikant höhere Phosphorylierung der *JNK*-Kaskade und der in Folge gesteigerten *c-Jun/AP-1*-Aktivierung für die beobachtete, signifikant höhere IFN- $\gamma$ -Expression von NKZ behandelter Mäuse herangezogen werden. Bei der Untersuchung von CD3<sup>+</sup>-Zellen (Proteinkomplex des T-Zell-Rezeptors, T-Zell-spezifisch), zeigte sich ein sehr unterschiedliches Verhalten der T-Zell-Subgruppen (**Abb. 17**), die zahlenmäßig vorrangig aus CD4<sup>+</sup>- sowie CD8<sup>+</sup>-Zellen bestehen. Da dieser Effekt unerwartet war, wurde in den vorangehenden Versuchen nicht weiter zwischen beiden Subgruppen differenziert. Wie in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beschrieben, bewirkt die Exposition gegenüber einer Laktatazidose von 20 mM in vitro eine vollständige, *JNK/c-Jun*-abhängige Suppression der IFN- $\gamma$ -Expression (Mendler *et al.*, 2012), welche durch Rekonstitution in pH-neutralem Medium rückgängig gemacht werden konnte. Die Vermutung liegt daher nahe, dass die erheblich besser auf Stimulation ansprechende Subgruppe (Daten nicht gezeigt) den zytotoxischen CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen entsprechen, die in der direkten Antitumorantwort NKZ ähneln. Zudem zeigten Yang, *et al.*, dass *JNK* in CD4<sup>+</sup>-T-Zellen eine zentrale Rolle in der Th1-Differenzierung zukommt. *JNK*<sup>-/-</sup>-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen exprimieren signifikant weniger IFN- $\gamma$  und weisen eine geringere IL-12R-Expression unter Th1-Konditionen auf (Yang *et al.*, 1998). Auch dies bedarf weiterer,

zukünftiger Untersuchungen. Trotz mangelnder Differenzierungsmöglichkeiten ließ sich dennoch eine gesteigerte Aktivierung des *p38*-Signalweges in CD3<sup>+</sup>-Zellen darstellen (**Abb. 19-B**); die beschriebene Inhibition von *p38* (Mendler *et al.*, 2012) konnte in unserem Versuchsansatz *in vivo* daher durch Neutralisierung der Tumorazidose ebenfalls aufgehoben werden.

Es konnte also gezeigt werden, dass durch die systemische Applikation von NaHCO<sub>3</sub> *in vivo* die Azidose-vermittelte Suppression der Signalwege der Effektorfunktion in NKZ rückgängig gemacht werden kann und eine Steigerung der *JNK*- und *ERK1/2*-vermittelten IFN- $\gamma$ -Expression zur Folge hat, dabei jedoch nicht zu einer verbesserten Degranulationsfähigkeit führt. Zudem könnte der verbesserte *JNK*- und *p38*-Signalweg in CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die immunologisch günstigere Th1-Differenzierung zur Folge haben und eine effektive Antitumorantwort stärken.

#### **4.3 Kompensation der Tumorazidose als Supportivum adoptiver NKZ-Transfers**

In den vorangehenden Experimenten konnte demonstriert werden, dass NKZ in dem hier verwendeten endogenen  $\lambda$ -myc-Lymphommodell mit fortschreitendem Krankheitsstadium progressiv ihre Effektorfunktion, also ihre IFN- $\gamma$ -Expression und Zytotoxizität verlieren (Brenner *et al.*, 2010; Belting *et al.*, 2015). Dieser Effekt konnte *in vitro* nachgestellt werden und war jeweils durch Beeinflussung des Laktatspiegels oder des pH-Wertes alleine evozierbar, wie er auch in den Tumoren der Versuchstiere gemessen werden konnte (Pötzl *et al.*, 2017). Ebenso war die IFN- $\gamma$ -Expression adoptiv transferierter WT-NKZ nach intratumoraler Migration in c-MYC-Mäusen signifikant eingeschränkt; dieser Effekt konnte jedoch durch Rekonstitution in tumorfreiem Medium rückgängig gemacht werden (Pötzl *et al.*, 2017). Es stellte sich daher die Frage, ob die intratumorale pH-Erhöhung bei systemischer Gabe von NaHCO<sub>3</sub> auch nach adoptivem Transfer *in vivo* einen positiven Effekt auf die NKZ-Funktion hat.

Hierfür wurden WT-Mäuse über die gleiche Zeitspanne der Vorversuche mit NaHCO<sub>3</sub> vorbehandelt, um diese an Tag 80 mit einer Tumorlast von 10<sup>7</sup> 291-Zellen (entsprechende  $\lambda$ -myc-Lymphomlinie) s.c. (subkutan) zu beladen. Die Neutralisierung der Tumorazidose wurde mittels pH-Sensoren überprüft (Pötzl *et al.*, 2017). WT-NKZ wurden mit einem CFSE-Äquivalent markiert, nach Anwachsen des Tumors intratumoral

appliziert und 24h später auf ihre IFN- $\gamma$ -Expression analysiert (**Abb. 20-A**).

Hierbei zeigte sich eine grundsätzlich höhere IFN- $\gamma$ -Expression in NKZ, wenn diese exogen appliziert wurden. Dieser Effekt ist vielfach beschrieben und auf den durch exogene Stimuli evozierten „Zytokinsturm“ zurückzuführen. Vergleicht man jedoch die IFN- $\gamma$ -Expression exogener bzw. endogener NKZ in therapierten Mäusen mit ihrem jeweiligen Korrelat der unbehandelten Gruppe, zeigt sich eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Steigerung der IFN- $\gamma$ -Expression in der Therapiegruppe (**Abb. 20-B**). Dieses Ergebnis stützt die in der Arbeit beschriebene These des immunsuppressiven Effektes der Laktatazidose und der supportiven Funktion der oralen Bikarbonatgabe auf die Funktion intratumoraler NKZ. In dem verwendeten Modell hatte der Tumor durch die konsequente Neutralisierung des abfallenden  $pH_e$  keine Gelegenheit, eine Laktatazidose zu entwickeln und damit eine inhibierende Funktion auf NKZ auszuüben. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt in ähnlichem Maße für CD8<sup>+</sup>-Effektor-T-Zellen (CTLs) gilt und daher eine vielversprechende, gleichzeitig nebenwirkungsarme Option zur Verbesserung adoptiver NK- bzw. T-Zell-Transfers darstellt.

#### 4.4 NKZ induzieren Th1-Differenzierung

Als Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem agieren NKZ - neben ihren direkten zytotoxischen Funktionen - durch inflammatorische Zytokine wie IFN- $\gamma$  und TNF als Primärmediatoren der frühen Immunantwort (Cerwenka and Lanier, 2001; Cooper and Yokoyama, 2010). Dabei induzieren sie gleichzeitig eine IFN- $\gamma$ -abhängige, effiziente Th1-Differenzierung (Szabo, *et al.*, 2002; Martín-Fontecha *et al.*, 2004) sowie zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antworten (Mocikat *et al.*, 2003). Dies geschieht einerseits durch Induktion der IL-12-Expression in DZs (Snijders *et al.*, 1998) sowie andererseits durch eine IFN- $\gamma$ -vermittelte IL-12R-Expression auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Afkarian *et al.*, 2002). Es ist weiterhin bekannt, dass eine effektive Tumorkontrolle von einer Th1-differenzierten Immunantwort abhängt (Egeter *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2009; Braumüller *et al.*, 2013).

Die Zytokinanalyse im Serum der untersuchten Versuchsgruppen zeigte in unbehandelten c-MYC<sub>ina</sub> einen deutlichen Anstieg an IL-5, einem im Rahmen der Th2-Differenzierung vorrangig von T-Helfer-Zellen (und Mastzellen) exprimierten Zytokin. Dieser Anstieg war am stärksten ausgeprägt, wenn NKZ experimentell depletiert wurden

(**Abb. 21-B**). Dieses Ergebnis stützt die These der zentralen Rolle von NKZ in der Th1-Differenzierung im Rahmen der Antitumorantwort. Auch die Serumkonzentration des proinflammatorischen Zytokins TNF korrelierte mit dem Krankheitsstadium und sank NKZ- und therapieabhängig (**Abb. 21-A**). Konträr zum langgültigen Glauben, dass TNF eine Funktion in der Antitumorantwort hat (Carswell *et al.*, 1975), ist in den vergangenen Jahren immer deutlicher geworden, dass TNF eine zentrale Rolle in der Tumorpromotion spielt (Leibovich *et al.*, 1987; Arnott *et al.*, 2002; Pfitzenmaier *et al.*, 2003; Michalaki *et al.*, 2004; Waters *et al.*, 2013). Dieser Paradigmenwechsel führte bereits zu klinischen Phase-II- und III-Studien u.a. mit *Etanercept*, *TNFERade* oder *NGF-hTNF*, die auf eine Antagonisierung des Zytokins abzielen (Madhusudan *et al.*, 2004, 2005; Senzer *et al.*, 2004; Harrison *et al.*, 2007). Eine reduzierte TNF-Konzentration unter Therapie ist daher prognostisch günstig zu deuten.

#### 4.5 Klinisch-therapeutische Anwendung

Die vorliegende Arbeit konnte zeigen, dass endogene NKZ durch die orale Applikation von  $\text{NaHCO}_3$  effizient intratumoral migrieren und sowohl endogene als auch adoptiv transferierte NKZ dort durch die Neutralisierung der Laktatazidose eine effektive Antitumorantwort bewirken können. Die Neutralisierung der Tumorzidose stellt daher eine attraktive Therapieoption in der Tumorummunologie dar und könnte beispielsweise supportiv zur Optimierung adoptiver NK- und T-Zell-Transfers angewandt werden, um einerseits die Migration in die Zielorgane zu verstärken und die direkte Antitumorantwort einzuleiten, andererseits um die immunologisch günstigen Interaktionen zwischen NK- und T-Zellen zu verbessern.

Die in dem vorliegenden Modell verwendete Konzentration von mit 200 mM  $\text{NaHCO}_3$  supplementiertem Trinkwasser entspricht in etwa einer Aufnahmedosis von 37 g/die bei einem 70 kg schweren Patienten.  $\text{NaHCO}_3$  ist in Form von Backpulver im Lebensmittelhandel sowie in Form von therapeutischen Antazida als *Over-The-Counter* (OTC)-Präparat rezeptfrei in Apotheken sehr unkompliziert erhältlich. Orales Bikarbonat wird bei manchen Erkrankungen, wie der Sichelzellanämie (Mann and Stuart, 1974) oder der Renalen Tubulären Azidose (Booth, Gates and Morris, 1984) bereits in therapeutischer Dosis erfolgreich eingesetzt. Eine chronische Anwendung, d.h. ein Einnahmezeitraum von mindestens 1 Jahr zeigte ein sehr nebenwirkungsarmes

pharmakologisches Profil, insbesondere im Vergleich mit Nebenwirkungsprofilen gängiger Immunmodulatoren. Zu beachten ist lediglich die reduzierte intestinale Resorption pH-abhängiger Pharmaka, wie Aspirin, Glucocorticoide oder Ketoconazol sowie unspezifische gastrointestinale Beschwerden durch den Metabolismus zu CO<sub>2</sub> (u.a. Meteorismus, Flatulenz, Diarrhö). Es ist offensichtlich, dass die vielfältigen tumorprotektiven Eigenschaften die negativen Konsequenzen überwiegen; es verwundert daher, dass diese Maßnahme trotz immer deutlicher werdender Datenlage und Publikationen (Robey *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2009; McCarty and Whitaker, 2010; Robey and Martin, 2011; Ibrahim-Hashim *et al.*, 2012; Damaghi *et al.*, 2015; Pilon-Thomas *et al.*, 2016; Pötzl, *et al.*, 2017) noch keinen Einzug in die klinische Medizin gefunden hat. Alternativ zu oralem Natriumbikarbonat könnten auch Protonenpumpeninhibitoren (PPIs; Omeprazol, Esomeprazol, Pantoprazol), Carboanhydrasehemmer (Azetazolamid) oder Medikamente, die zu einer kompensierten, metabolischen Alkalose führen, wie etwa Schleifendiuretika (Furosemid, Torasemid) die beobachtete Wirkung erzielen (Li *et al.*, 2007; Bin and Shi-Peng, 2011; Mokhtari *et al.*, 2013; Mohammadpour *et al.*, 2014). Für PPIs konnte vielfach beschrieben werden, dass sie als schwache Basen in saurem Milieu akkumulieren und die Tumorzidose durch Inhibition vakuolärer H<sup>+</sup>-ATPasen (V-H<sup>+</sup>-ATPasen) reduzieren. Zusätzlich zur immunpotenzierenden Wirkung (Fais, 2010; Vishvakarma and Singh, 2010) wird beispielsweise Omeprazol zur sensibilisierenden Vorbehandlung bei Gabe von Cisplatin, 5-FU oder Vinblastin eingesetzt (Luciani *et al.*, 2004; De Milito and Fais, 2005; De Milito *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Die Ergebnisse zur Auswirkung der tumoralen Laktatazidose auf die Funktion von NKZ liefern einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des immunsuppressiven Tumormikromilieus und bieten Ausblick auf zukünftige, therapeutisch anwendbare Interventionen.

#### 4.6 Ausblick

Eine der vorrangigen Fragen, die die vorliegende Arbeit aufwirft, ist, wie es zur partiellen Inhibition der Effektorfunktion von NKZ kommt. Die Versuche zeigten eine ausgeprägte Aktivierung des *ERK-1/2*-Signalweges unter Therapie und eine konsekutiv gesteigerte IFN- $\gamma$ -Expression, ohne dabei jedoch die ebenfalls über ERK vermittelten Mechanismen der Degranulation zu beeinflussen. Des Weiteren ist es bemerkenswert, dass die *ERK-*

und *JNK*-abhängige Expression von AP-1 unter Therapie zu einer gesteigerten Expression von IFN- $\gamma$  führt, das über denselben Mechanismus regulierte TNF hingegen gegensätzlich exprimiert zu werden scheint.

Auch sollten die o.g. Signalkaskaden unter Therapie in CD3<sup>+</sup>-Zellen genauer analysiert werden, um zu verstehen, wie sich die Behandlung auf die T-Zell-Subpopulationen, wie CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen *in vivo* auswirkt und welche Unterschiede hierbei zu beobachten sind.

Zudem wäre es interessant, ob sich die Ergebnisse des adoptiven NK-Zell-Transfers im „realistischeren“, endogen wachsenden c-MYC-Lymphommodell reproduzieren ließen, da sich gezeigt hat, dass die Immunantwort im transplantierbaren Tumormodell mitunter sehr unterschiedlich ausfallen kann.

# LITERATURVERZEICHNIS

---

- Afkarian, M. *et al.* (2002) 'T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells.', *Nature immunology*, 3(6), pp. 549–57. doi: 10.1038/ni794.
- Arnott, C. H. *et al.* (2002) 'Tumour necrosis factor- $\alpha$  mediates tumour promotion via a PKC $\alpha$ - and AP-1-dependent pathway', *Oncogene*, 21(31), pp. 4728–4738. doi: 10.1038/sj.onc.1205588.
- Belting, L. *et al.* (2015) 'Critical role of the NKG2D receptor for NK cell-mediated control and immune escape of B-cell lymphoma', *European Journal of Immunology*, 45(9), pp. 2593–2601. doi: 10.1002/eji.201445375.
- Bernard, K. *et al.* (1999) 'Engagement of natural cytotoxicity programs regulates AP-1 expression in the NKL human NK cell line.', *Journal of immunology*, 162(7), pp. 4062–8.
- Bin, K. and Shi-Peng, Z. (2011) 'Acetazolamide Inhibits Aquaporin-1 Expression and Colon Cancer Xenograft Tumor Growth', *Hepatogastroenterology*, 58(110–111), pp. 1502–6. doi: 10.5754/hge11154.
- Booth, B. E., Gates, J. and Morris, R. C. (1984) 'Grocery Store Baking Soda: A Source of Sodium Bicarbonate in the Management of Chronic Metabolic Acidosis', *Clinical Pediatrics*, 23(2), pp. 94–96. doi: 10.1177/000992288402300205.
- Braumüller, H. *et al.* (2013) 'T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence.', *Nature*, 494(7437), pp. 361–5. doi: 10.1038/nature11824.
- Brenner, C. D. *et al.* (2010) 'Requirements for control of B-cell lymphoma by NK cells', *European Journal of Immunology*, 40, pp. 494–504. doi: 10.1002/eji.200939937.
- Brisson, L. *et al.* (2012) 'PH regulators in invadosomal functioning: Proton delivery for matrix tasting', *European Journal of Cell Biology*, 91(11–12), pp. 847–860. doi: 10.1016/j.ejcb.2012.04.004.
- van den Broek, M. *et al.* (1995) 'Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo', *European Journal of Immunology*, 25(12), pp. 3514–3516. doi: 10.1002/eji.1830251246.
- van den Broek, M. *et al.* (1996) 'Decreased Tumor Surveillance in Perforin-deficient Mice', *J Exp Med*, 184.
- Brunner, K. T. *et al.* (1968) 'Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs.', *Immunology*, 14(2), pp. 181–96.
- Bruno, S. and Darzynkiewicz, Z. (1992) 'Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells', *Cell Proliferation*, 25(1), pp. 31–40. doi: 10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x.
- Burnet, F. M. (1970) 'The concept of immunological surveillance.', *Progress in experimental tumor research*, 13, pp. 1–27.
- Burnet, S. M. (1957) 'Cancer-a Biological Approach Iii. Viruses Associated With Neoplastic



- Conditions', *British Medical Journal*, 1, pp. 841–847. doi: 10.1136/bmj.1.5023.841.
- Burnet, S. M. (1964) 'IMMUNOLOGICAL FACTORS IN THE PROCESS OF CARCINOGENESIS.', *British medical bulletin*, 20(2), pp. 154–8. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070310.
- Carswell, E. A. *et al.* (1975) 'An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors (activated macrophage)', *Immunology*, 72(9), pp. 3666–3670. doi: 10.1073/pnas.72.9.3666.
- Cerwenka, A. and Lanier, L. L. (2001) 'NATURAL KILLER CELLS, VIRUSES AND CANCER', *Nature Reviews Immunology*, 1, pp. 41–49.
- Chen, M. *et al.* (2009) 'Effects and mechanisms of proton pump inhibitors as a novel chemosensitizer on human gastric adenocarcinoma (SGC7901) cells', *Cell Biology International*, 33(9), pp. 1008–1019. doi: 10.1016/j.cellbi.2009.05.004.
- Della Chiesa, M. *et al.* (2006) 'The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function', *Blood*, 108(13), pp. 4118–4125. doi: 10.1182/blood-2006-03-006700.
- Coca, S. *et al.* (1997) 'The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma.', *Cancer*, 79(12), pp. 2320–2328.
- Cooper, M. a and Yokoyama, W. M. (2010) 'Memory-like responses of natural killer cells', *Immunol Rev*, 235(1), pp. 297–305. doi: 10.1111/j.0105-2896.2010.00891.x.
- Damaghi, M. *et al.* (2015) 'Chronic acidosis in the tumour microenvironment selects for overexpression of LAMP2 in the plasma membrane', *Nature Communications*, 6, p. 8752. doi: 10.1038/ncomms9752.
- Damaghi, M., Wojtkowiak, J. W. and Gillies, R. J. (2013) 'pH sensing and regulation in cancer', *Frontiers in Physiology*, pp. 1–10. doi: 10.3389/fphys.2013.00370.
- DeBerardinis, R. J. (2008) 'Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea.', *Genetics in Medicine*, 10(11), pp. 767–77. doi: 10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b.
- Denko, N. C. (2008) 'Hypoxia, HIF and metabolism in the solid tumour', *Nature reviews. Cancer*, 8, pp. 705–13. doi: 10.1038/nrc2468.
- Deschoolmeester, V. *et al.* (2010) 'Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients', *BMC Immunology*, 11(1), p. 19. doi: 10.1186/1471-2172-11-19.
- Dong, C., Davis, R. J. and Flavell, R. a. (2002) 'MAP KINASES IN THE IMMUNE RESPONSE', *Annual Review of Immunology*, 20(1), pp. 55–72. doi: 10.1146/annurev.immunol.20.091301.131133.
- Dunn, G. P. *et al.* (2007) 'Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape', *Immunology*, 121(1), pp. 1–14. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02587.x.
- Egeter, O. *et al.* (2000) 'Eradication of Disseminated Lymphomas with CpG-DNA Activated T Helper Type 1 Cells from Nontransgenic Mice Advances in Brief Eradication of Disseminated Lymphomas with CpG-DNA Activated T Helper Type 1 Cells from Nontransgenic Mice 1', *Cancer Research*, 60, pp. 1515–1520.
- Estrella, V. *et al.* (2013) 'Acidity generated by the tumor microenvironment drives local invasion', *Cancer Research*, 73(5), pp. 1524–1535. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2796.

Fais, S. (2010) 'Proton pump inhibitor-induced tumour cell death by inhibition of a detoxification mechanism: Symposium', *Journal of Internal Medicine*, 267(5), pp. 515–525. doi: 10.1111/j.1365-2796.2010.02225.x.

Fischer, K. *et al.* (2015) 'Inhibitory Effect of Tumor Cell-Derived Lactic Acid on Human T Cells', *Blood*, 109(9), pp. 3812–3820. doi: 10.1182/blood-2006-07-035972.The.

Fukuda, M. (1991) 'Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking.', *The Journal of biological chemistry*, 266(32), pp. 21327–30.

Fukumura, D. *et al.* (2001) 'Hypoxia and Acidosis Independently Up-Regulate Vascular Endothelial Growth Factor Transcription in Brain Tumors in Vivo', *Cancer Research*, pp. 6020–6024.

Gabrilovich, D. I. and Nagaraj, S. (2009) 'Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system.', *Nature reviews. Immunology*, 9(3), pp. 162–74. doi: 10.1038/nri2506.

Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2004) 'Why do cancers have high aerobic glycolysis?', *Nature Reviews Cancer*, 4(11), pp. 891–899. doi: 10.1038/nrc1478.

Gatenby, R. A. and Gillies, R. J. (2008) 'A microenvironmental model of carcinogenesis.', *Nature reviews. Cancer*, 8(1), pp. 56–61. doi: 10.1038/nrc2255.

Ghiringhelli, F. *et al.* (2006) 'The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: Relevance during tumor progression', *Immunological Reviews*, 214(1), pp. 229–238. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00445.x.

Godin-Ethier, J. *et al.* (2011) 'Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in human cancers: clinical and immunologic perspectives', *Clin Cancer Res*, 17(22), pp. 6985–6991. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-11-1331.

Goretzki, L. *et al.* (1992) 'Effective activation of the proenzyme form of the urokinase-type plasminogen activator (pro-uPA) by the cysteine protease cathepsin L', *FEBS Letters*, 297(1–2), pp. 112–118. doi: 10.1016/0014-5793(92)80339-I.

Gottfried, E. *et al.* (2006) 'Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression.', *Blood*. American Society of Hematology, 107(5), pp. 2013–21. doi: 10.1182/blood-2005-05-1795.

Griffiths, G. M. and Isaaz, S. (1993) 'Granzymes A and B Are Targeted to the Lytic Granules of Lymphocytes by the Mannose-6-Phosphate Receptor', *The Journal of Cell Biology*, 120(4), pp. 885–896.

Groh, V. *et al.* (2002) 'Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.', *Nature*, 419(6908), pp. 734–738. doi: 10.1038/nature01112.

Groom, J. R. *et al.* (2012) 'CXCR3 Chemokine Receptor-Ligand Interactions in the Lymph Node Optimize CD4+ T Helper 1 Cell Differentiation', *Immunity*, 37(6), pp. 1091–1103. doi: 10.1016/j.immuni.2012.08.016.

Groom, J. R. and Luster, A. D. (2011) 'CXCR3 ligands: redundant, collaborative and antagonistic functions', *Immunology and Cell Biology*, 89(2), pp. 207–215. doi: 10.1038/icb.2010.158.

Harrison, M. L. *et al.* (2007) 'Tumor Necrosis Factor alpha As a New Target for Renal Cell Carcinoma: Two Sequential Phase II Trials of Infliximab at Standard and High Dose', *Journal of Clinical Oncology*, 25(29), pp. 4542–4549. doi: 10.1200/JCO.2007.11.2136.

- Hayakawa, Y. *et al.* (2006) 'Functional subsets of mouse natural killer cells', *Immunological Reviews*, 214(1), pp. 47–55. doi: 10.1111/j.1600-065X.2006.00454.x.
- Hideto, N. *et al.* (2011) 'NK Cell-Depleting Anti-Asialo GM1 Ab Exhibits a Lethal Off-Target Effect on Basophils In Vivo', *J Immunol*, 186, pp. 5766–5771. doi: 10.4049/jimmunol.1100370.
- Hilpert, J. *et al.* (2012) 'Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses.', *The Journal of Immunology*, 189(3), pp. 1360–1371. doi: 10.4049/jimmunol.1200796.
- Hirschhaeuser, F., Sattler, U. G. A. and Mueller-Klieser, W. (2011) 'Lactate: A metabolic key player in cancer', *Cancer Research*, 71(22), pp. 6921–6925. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1457.
- Hurwitz, A. A. and Watkins, S. K. (2012) 'Immune suppression in the tumor microenvironment: A role for dendritic cell-mediated tolerization of T cells', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(2), pp. 289–293. doi: 10.1007/s00262-011-1181-5.
- Ibrahim-Hashim, A. *et al.* (2012) 'Systemic buffers inhibit carcinogenesis in TRAMP mice', *Journal of Urology*. Elsevier Inc., 188(2), pp. 624–631. doi: 10.1016/j.juro.2012.03.113.
- Ishigami, S. *et al.* (2000) 'Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma', *Cancer*, 88(3), pp. 577–583. doi: 10.1002/(SICI)1097-0142(20000201)88:3<577::AID-CNCR13>3.0.CO;2-V.
- Jeffrey, K. L. *et al.* (2007) 'Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses.', *Nature reviews. Drug discovery*, 6(5), pp. 391–403. doi: 10.1038/nrd2289.
- Kasai, M. *et al.* (1981) 'In vivo effect of anti-asialo GM1 antibody on natural killer activity', *Nature*, 291(5813), pp. 334–335. doi: 10.1038/291334a0.
- Kiessling, R. *et al.* (1975) "'Natural" killer cells in the mouse', *European journal of immunology*, (5), pp. 112–117. doi: 10.1002/eji.1830050208.
- Kim, H. S. *et al.* (2012) 'COX2 overexpression is a prognostic marker for Stage III breast cancer', *Breast Cancer Res Treat*, 132(1), pp. 51–59. doi: 10.1007/s10549-011-1521-3.
- Kovalchuk, A. L. *et al.* (2000) 'Burkitt lymphoma in the mouse.', *The Journal of experimental medicine*, 192(8), pp. 1183–90. doi: 10.1084/jem.192.8.1183.
- Kumar, S., Reusch, H. P. and Ladilov, Y. (2008) 'Acidic pre-conditioning suppresses apoptosis and increases expression of Bcl-xL in coronary endothelial cells under simulated ischaemia', *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 12(5A), pp. 1584–1592. doi: 10.1111/j.1582-4934.2007.00172.x.
- Lardner, A. (2001) 'The effects of extracellular pH on immune function', *Journal of leukocyte biology*, 69(4), pp. 522–530.
- Lee, U. *et al.* (1996) 'Murine asialo GM1+CD8+ T cells as novel interleukin-12-responsive killer T cell precursors.', *Japanese journal of cancer research*, pp. 429–432. doi: 0910-5050.
- Leibovich, S. J. *et al.* (1987) 'Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor- $\alpha$ ', *Nature*, 329(6140), pp. 630–632. doi: 10.1038/329630a0.
- Li, H. *et al.* (2009) 'Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK

cells through membrane-bound TGF-beta 1.', *Journal of immunology*, 182(1), pp. 240–249. doi: 182/1/240 [pii].

Li, X. J. *et al.* (2007) 'Effects of acetazolamide combined with or without NaHCO<sub>3</sub> on suppressing neoplasm growth, metastasis and aquaporin-1 (AQP1) protein expression', *International Journal of Molecular Sciences*, 8(3), pp. 229–240. doi: 10.3390/i8030229.

Loeffler, D. A., Heppner, G. H. and Juneau, P. L. (1991) 'Natural killer-cell activity under conditions reflective of tumor micro-environment', *International Journal of Cancer*, 48(6), pp. 895–899. doi: 10.1002/ijc.2910480617.

Luciani, F. *et al.* (2004) 'Effect of proton pump inhibitor pretreatment on resistance of solid tumors to cytotoxic drugs', *Journal of the National Cancer Institute*, 96(22), pp. 1702–1713. doi: 10.1093/jnci/djh305.

Lyons, a. B. and Parish, C. R. (1994) 'Determination of lymphocyte division by flow cytometry', *Journal of Immunological Methods*, 171(1), pp. 131–137. doi: 10.1016/0022-1759(94)90236-4.

Madhusudan, S. *et al.* (2004) 'A phase II study of etanercept (Enbrel), a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer', *Clin. Cancer Res.*, 10(19), pp. 6528–6534. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0730.

Madhusudan, S. *et al.* (2005) 'Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer', *Journal of Clinical Oncology*, 23(25), pp. 5950–5959. doi: 10.1200/JCO.2005.04.127.

Mann, J. R. and Stuart, J. (1974) 'Sodium Bicarbonate Prophylaxis of Sickle Cell Crisis', *Pediatrics*, 53(3).

Martín-Fontecha, A. *et al.* (2004) 'Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for TH1 priming.', *Nature immunology*, 5(12), pp. 1260–5. doi: 10.1038/ni1138.

McCarty, M. F. and Whitaker, J. (2010) 'Manipulating tumor acidification as a cancer treatment strategy', *Alternative Medicine Review*, 15(3), pp. 264–272.

Mendler, A. N. *et al.* (2012) 'Tumor lactic acidosis suppresses CTL function by inhibition of p38 and JNK/c-Jun activation.', *International journal of cancer.*, 131(3), pp. 633–40. doi: 10.1002/ijc.26410.

Michalaki, V. *et al.* (2004) 'Serum levels of IL-6 and TNF-alpha correlate with clinicopathological features and patient survival in patients with prostate cancer.', *British journal of cancer*, 90(12), pp. 2312–6. doi: 10.1038/sj.bjc.6601814.

Milella, M. *et al.* (1997) 'CD16 cross-linking induces both secretory and extracellular signal-regulated kinase (ERK)-dependent cytosolic phospholipase A2 (PLA2) activity in human natural killer cells: involvement of ERK, but not PLA2, in CD16-triggered granule exocytosis.', *Journal of immunology*, 158(7), pp. 3148–54.

De Milito, A. *et al.* (2007) 'Proton pump inhibitors induce apoptosis of human B-cell tumors through a caspase-independent mechanism involving reactive oxygen species', *Cancer Research*, 67(11), pp. 5408–5417. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-4095.

De Milito, A. and Fais, S. (2005) 'Proton pump inhibitors may reduce tumour resistance', *Expert Opin. Pharmacother*, 6(7), pp. 1049–1054. doi: 10.1517/14656566.6.7.1049.

Mocikat, R. *et al.* (2003) 'Natural killer cells activated by MHC class I low targets prime

- dendritic cells to induce protective CD8 T cell responses', *Immunity*, 19(4), pp. 561–569. doi: 10.1016/S1074-7613(03)00264-4.
- Moellering, R. E. *et al.* (2008) 'Acid treatment of melanoma cells selects for invasive phenotypes', *Clinical and Experimental Metastasis*, 25(4), pp. 411–425. doi: 10.1007/s10585-008-9145-7.
- Mohammadpour, R. *et al.* (2014) 'Acetazolamide triggers death inducing autophagy in T-47D breast cancer cells', *Cell Biology International*, 38(2), pp. 228–238. doi: 10.1002/cbin.10197.
- Mokhtari, R. B. *et al.* (2013) 'Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines.', *BMC cancer*, 13(1), p. 378. doi: 10.1186/1471-2407-13-378.
- Morita, T. *et al.* (1992) 'Clastogenicity of low pH to various cultured mammalian cells', *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 268(2), pp. 297–305. doi: 10.1016/0027-5107(92)90235-T.
- Nagaraj, S. and Gabrilovich, D. I. (2008) 'Tumor escape mechanism governed by myeloid-derived suppressor cells', *Cancer Research*, 68(8), pp. 2561–2563. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6229.
- Nagase, H. and Woessner, J. (1999) 'Matrix metalloproteinases', *Journal of Biological Chemistry*, (37), pp. 1–4.
- Nausch, N. *et al.* (2008) 'Mononuclear myeloid-derived &quot;suppressor&quot; cells express RAE-1 and activate natural killer cells.', *Blood*, 112(10), pp. 4080–9. doi: 10.1182/blood-2008-03-143776.
- O'Sullivan, T. *et al.* (2012) 'Cancer immunoediting by the innate immune system in the absence of adaptive immunity', *The Journal of Experimental Medicine*, 209(10), pp. 1869–1882. doi: 10.1158/1538-7445.AM2012-526.
- Orange, J. S. (2008) 'Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse', *Nature Reviews Immunology*, 8(9), pp. 713–725. doi: 10.1038/nri2381.
- Parks, S. K., Chiche, J. and Pouyssegur, J. (2013) 'Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 13(9), pp. 611–623. doi: 10.1038/nrc3579.
- Pavlidis, S. *et al.* (2009) 'The reverse Warburg effect: Aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma', *Cell Cycle*, 8(23), pp. 3984–4001. doi: 10.4161/cc.8.23.10238.
- Pavlidis, S. *et al.* (2012) 'Warburg Meets Autophagy: Cancer-Associated Fibroblasts Accelerate Tumor Growth and Metastasis via Oxidative Stress, Mitophagy, and Aerobic Glycolysis', *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(11), pp. 1264–1284. doi: 10.1089/ars.2011.4243.
- Peppicelli, S. *et al.* (2014) 'Contribution of acidic melanoma cells undergoing epithelial-to-mesenchymal transition to aggressiveness of non-acidic melanoma cells', *Clinical and Experimental Metastasis*, 31(4), pp. 423–433. doi: 10.1007/s10585-014-9637-6.
- Peppicelli, S. and Bianchini, F. (2013) 'Acidic pH via NF- $\kappa$ B favours VEGF-C expression in human melanoma cells', *Clinical & Experimental Metastasis*, 30(8), pp. 957–967. doi: 10.1007/s10585-013-9595-4.

- Peppicelli, S., Bianchini, F. and Calorini, L. (2014) 'Extracellular acidity, a "reappreciated" trait of tumor environment driving malignancy: perspectives in diagnosis and therapy.', *Cancer metastasis reviews*, 33(2–3), pp. 823–32. doi: 10.1007/s10555-014-9506-4.
- Pfitzenmaier, J. *et al.* (2003) 'Elevation of cytokine levels in cachectic patients with prostate carcinoma', *Cancer*, 97(5), pp. 1211–1216. doi: 10.1002/cncr.11178.
- Pham, C. T. and Ley, T. J. (1999) 'Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo.', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(15), pp. 8627–8632. doi: 10.1073/pnas.96.15.8627.
- Pilon-Thomas, S. *et al.* (2016) 'Neutralization of tumor acidity improves antitumor responses to immunotherapy', *Cancer Research*, 76(6), pp. 1381–1390. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-15-1743.
- Pisegna, S. *et al.* (2004) 'p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells', *Blood*, 104(13), pp. 4157–4164. doi: 10.1182/blood-2004-05-1860.Partially.
- Pötzl, J. *et al.* (2017) 'Reversal of tumor acidosis by systemic buffering reactivates NK cells to express IFN- $\gamma$  and induces NK cell-dependent lymphoma control without other immunotherapies.', *International journal of cancer*. doi: 10.1002/ijc.30646.
- Praper, T. *et al.* (2010) 'Human perforin permeabilizing activity, but not binding to lipid membranes, is affected by pH', *Molecular Immunology*, 47(15), pp. 2492–2504. doi: 10.1016/j.molimm.2010.06.001.
- Przewoznik, M. *et al.* (2012) 'Recruitment of natural killer cells in advanced stages of endogenously arising B-cell lymphoma: implications for therapeutic cell transfer.', *Journal of immunotherapy*, 35(3), pp. 217–22. doi: 10.1097/CJI.0b013e318247440a.
- Raghunand, N. *et al.* (2001) 'Acute metabolic alkalosis enhances response of C3H mouse mammary tumors to the weak base mitoxantrone.', *Neoplasia*, 3(3), pp. 227–235. doi: 10.1038/sj/neo/7900151.
- Rincón, M. and Davis, R. J. (2009) 'Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases', *Immunological Reviews*, 228(1), pp. 212–224. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00744.x.
- Robertson, M. J. (2010) 'Role of chemokines in the biology of natural killer cells', *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 341(1), pp. 37–58. doi: 10.1007/82-2010-20.
- Robey, I. F. *et al.* (2009) 'Bicarbonate Increases Tumor pH and Inhibits Spontaneous Metastases', *Cancer Research*, 69(6), pp. 2260–2268. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5575.
- Robey, I. F. and Martin, N. K. (2011) 'Bicarbonate and dichloroacetate: evaluating pH altering therapies in a mouse model for metastatic breast cancer.', *BMC cancer*, 11(1), p. 235. doi: 10.1186/1471-2407-11-235.
- Robinson, M. J. and Cobb, M. H. (1997) 'Mitogen-activated protein kinase pathways', *Current Opinion in Cell Biology*, 9(2), pp. 180–186. doi: 10.1016/S0955-0674(97)80061-0.
- Röttinger, E. M. and Mendonca, M. (1982) 'Radioresistance secondary to low pH in human glial cells and Chinese hamster ovary cells.', *International journal of radiation oncology, biology, physics*, 8(8), pp. 1309–14. doi: 10.1016/0360-3016(82)90580-6.

- Rozhin, J. *et al.* (1994) 'Pericellular pH Affects Distribution and Secretion of Cathepsin B in Malignant Cells', *Cancer Research*, 54(24), pp. 6517–6525.
- Ryder, C. *et al.* (2012) 'Acidosis promotes Bcl-2 family-mediated evasion of apoptosis: Involvement of acid-sensing G protein-coupled receptor GPR65 signaling to MEK/ERK', *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), pp. 27863–27875. doi: 10.1074/jbc.M112.384685.
- Salih, H. R., Rammensee, H. H.-G. and Steinle, A. (2002) 'Cutting Edge: Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding', *The Journal of Immunology*, 169(8), pp. 4098–4102. doi: 10.4049/jimmunol.169.8.4098.
- Sanderson, A. R. (1965) 'Quantitative Titration, Kinetic Behaviour, and Inhibition of Cytotoxic Mouse Isoantisera', *Immunology*, 19(9), p. 287.
- Sauty, A. *et al.* (2001) 'CXCR3 Internalization Following T Cell-Endothelial Cell Contact: Preferential Role of IFN-Inducible T Cell Chemoattractant (CXCL11)', *The Journal of Immunology*, 167(12), pp. 7084–7093. doi: 10.4049/jimmunol.167.12.7084.
- Senzer, N. N. *et al.* (2004) 'TNFerade Biologic, an Adenovector With a Radiation-Inducible Promoter, Carrying the Human Tumor Necrosis Factor Alpha Gene: A Phase I Study in Patients With Solid Tumors', *J. Clin. Oncol.*, 22(4), p. 0. doi: 10.1200/JCO.2004.01.227.
- Shi, Q. *et al.* (2001) 'Regulation of vascular endothelial growth factor expression by acidosis in human cancer cells.', *Oncogene*, 20(28), pp. 3751–3756. doi: 10.1038/sj.onc.1204500.
- Sierro, F. *et al.* (2007) 'Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7.', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(37), pp. 14759–64. doi: 10.1073/pnas.0702229104.
- Silva, A. S. *et al.* (2009) 'The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion', *Cancer Research*, 69(6), pp. 2677–2684. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2394.
- Smyth, M. J. *et al.* (2000) 'Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma', *J Exp Med*, 192(5), pp. 755–760. doi: 10.1084/jem.192.5.755.
- Smyth, M. J. *et al.* (2006) 'CD4+CD25+ T Regulatory Cells Suppress NK Cell-Mediated Immunotherapy of Cancer', *The Journal of Immunology*, 176, pp. 1582–1587. doi: 10.4049/jimmunol.176.3.1582.
- Snijders, A. *et al.* (1998) 'High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals', *Int Immunol*, 10(11), pp. 1593–1598. doi: 10.1093/intimm/10.11.1593.
- Sonveaux, P. *et al.* (2008) 'Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice', *The Journal of clinical investigation*, 118(12), pp. 1–13.
- Stojanovic, A. and Cerwenka, A. (2011) 'Natural killer cells and solid tumors', *Journal of Innate Immunity*, 3(4), pp. 355–364. doi: 10.1159/000325465.
- Su, B. and Karin, M. (1996) 'Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression.', *Current opinion in immunology*, 8(3), pp. 402–411. doi: 10.1016/s0952-7915(96)80131-2.
- Sutton, V. R., Vaux, D. L. and Trapani, J. A. (1997) 'Bcl-2 prevents apoptosis induced by perforin and granzyme B but not that mediated by whole cytotoxic lymphocytes', *The Journal of Immunology*, 95, pp. 0–7.

- Szabo, Susanne J.; Sullivan, Brandon M.; Peng, S. L. (2002) 'Molecular Mechanisms regulating TH1 Immune Responses', *Annual Review of Physical Chemistry*, 53(1), pp. 141–172. doi: 10.1146/annurev.physchem.53.082201.124330.
- Takanami, I., Takeuchi, K. and Giga, M. (2001) 'The prognostic value of natural killer cell infiltration in resected pulmonary adenocarcinoma.', *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 121(6), pp. 1058–1063. doi: 10.1067/mtc.2001.113026.
- Terme, M. *et al.* (2011) 'IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer', *Cancer Research*, 71(16), pp. 5393–5399. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0993.
- Thews, O. *et al.* (2006) 'Impact of extracellular acidity on the activity of P-glycoprotein and the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs.', *Neoplasia*, 8(2), pp. 143–52. doi: 10.1593/neo.05697.
- Trambley, J. *et al.* (1999) 'Asialo GM1(+) CD8(+) T cells play a critical role in costimulation blockade-resistant allograft rejection.', *The Journal of clinical investigation*, 104(12), pp. 1715–1722. doi: 10.1172/JCI8082.
- Trotta, R. *et al.* (1998) 'Dependence of both spontaneous and antibody-dependent, granule exocytosis-mediated NK cell cytotoxicity on extracellular signal-regulated kinases.', *Journal of immunology*, 161(12), pp. 6648–56.
- Trotta, R. *et al.* (2000) 'Differential Role of p38 and c-Jun N-Terminal Kinase 1 Mitogen-Activated Protein Kinases in NK Cell Cytotoxicity', *The Journal of Immunology*, 165(4), pp. 1782–1789. doi: 10.4049/jimmunol.165.4.1782.
- Trotta, R., Kanakaraj, P. and Perussia, B. (1996) 'Fc gamma R-dependent mitogen-activated protein kinase activation in leukocytes: a common signal transduction event necessary for expression of TNF-alpha and early activation genes.', *The Journal of experimental medicine*, 184(3), pp. 1027–35. doi: 10.1084/jem.184.3.1027.
- Vihinen, P. and Kähäri, V.-M. (2002) 'Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets.', *International journal of cancer*, 99(2), pp. 157–66. doi: 10.1002/ijc.10329.
- Villegas, F. R. *et al.* (2002) 'Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer', *Lung Cancer*, 35(1), pp. 23–28. doi: 10.1016/S0169-5002(01)00292-6.
- Vishvakarma, N. K. and Singh, S. M. (2010) 'Immunopotentiating effect of proton pump inhibitor pantoprazole in a lymphoma-bearing murine host: Implication in antitumor activation of tumor-associated macrophages', *Immunology Letters*, 134(1), pp. 83–92. doi: 10.1016/j.imlet.2010.09.002.
- Vivar, N. *et al.* (2013) 'Endogenously Produced Lactic Acid Dendritic Cell Reprogramming by Dendritic Cell Reprogramming by Endogenously Produced Lactic Acid', *The Journal of Immunology*, 191, pp. 3090–3099. doi: 10.4049/jimmunol.1300772.
- Voskoboinik, I. *et al.* (2005) 'Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491', *Journal of Biological Chemistry*, 280(9), pp. 8426–8434. doi: 10.1074/jbc.M413303200.
- Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. and Trapani, J. a (2015) 'Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology.', *Nature reviews. Immunology*, 15(6), pp. 388–400. doi: 10.1038/nri3839.



- Wald, O. *et al.* (2006) 'IFN-gamma acts on T cells to induce NK cell mobilization and accumulation in target organs.', *Journal of immunology*, 176(8), pp. 4716–29. doi: 176/8/4716 [pii].
- Walenta, S. *et al.* (2000) 'High Lactate Levels Predict Likelihood of Metastases , Tumor Recurrence , and Restricted Patient Survival in Human Cervical Cancers', *Cancer Research*, 60, pp. 916–921.
- Waters, J., Pober, J. and Bradley, J. (2013) 'Tumour necrosis factor and cancer.', *J Pathol.*, 230(3), pp. 241–248.
- Webb, B. A. *et al.* (2011) 'Dysregulated pH: a perfect storm for cancer progression', *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group, 11(9), pp. 671–677. doi: 10.1038/nrc3110.
- Webb, S. D., Sherratt, J. A. and Fish, R. G. (1999) 'Alterations in proteolytic activity at low pH and its association with invasion: A theoretical model', *Clinical and Experimental Metastasis*, 17(5), pp. 397–407. doi: 10.1023/A:1006667303583.
- Wehner, R. *et al.* (2011) 'The bidirectional crosstalk between human dendritic cells and Natural killer cells', *Journal of Innate Immunity*, 3(3), pp. 258–263. doi: 10.1159/000323923.
- Wei, S. *et al.* (1998) 'Control of lytic function by mitogen-activated protein kinase/extracellular regulatory kinase 2 (ERK2) in a human natural killer cell line: identification of perforin and granzyme B mobilization by functional ERK2.', *The Journal of experimental medicine*, 187(11), pp. 1753–65. doi: 10.1084/jem.187.11.1753.
- Wendel, M. *et al.* (2008) 'Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN-gamma and CXCR3 ligands', *Cancer Research*, 68(20), pp. 8437–8445. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1440.
- Wennerberg, E. *et al.* (2014) 'CXCL10-induced migration of adoptively transferred human natural killer cells toward solid tumors causes regression of tumor growth in vivo', *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 64(2), pp. 225–235. doi: 10.1007/s00262-014-1629-5.
- Wherry, E. J. (2011) 'T cell exhaustion.', *Nature immunology*, 12(6), pp. 492–499. doi: 10.1038/ni.2035.
- Wojtkowiak, J. W. *et al.* (2012) 'Chronic autophagy is a cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironments', *Cancer Research*, 72(16), pp. 3938–3947. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3881.
- Wysk, M. *et al.* (1999) 'Requirement of mitogen-activated protein kinase kinase 3 (MKK3) for tumor necrosis factor-induced cytokine expression.', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96(7), pp. 3763–8. doi: 10.1073/pnas.96.7.3763.
- Xu, L. and Fidler, I. J. (2000) 'Acidic pH-induced elevation in interleukin 8 expression by human ovarian carcinoma cells', *Cancer Res*, 60(16), pp. 4610–4616. doi: 10.1016/s0065-230x(08)60946-x.
- Xu, L., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2002) 'Acidic extracellular pH induces vascular endothelial growth factor (VEGF) in human glioblastoma cells via ERK1/2 MAPK signaling pathway. Mechanism of low pH-induced VEGF', *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), pp. 11368–11374. doi: 10.1074/jbc.M108347200.
- Yang, D. D. *et al.* (1998) 'Differentiation of CD4+ T cells to Th1 cells requires MAP kinase JNK2.', *Immunity*, 9(4), pp. 575–85. doi: 10.1016/S1074-7613(00)80640-8.

Ziegler, A. *et al.* (2009) 'EpCAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion', *Blood*, 113(15), pp. 3494–3502. doi: 10.1182/blood-2008-08-175109.

# ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

|   |   |
|---|---|
| 5-FU                                      | 5-Fluoruracil   |
| ADCC                                      | Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity              |
| AKT                                       | Proteinkinase B                                       |
| ANOVA                                     | Analysis of Variance                                  |
| AP-1                                      | Aktivator Komplex 1                                   |
| APZ                                       | Antigenpräsentierende Zelle                           |
| Asialo-GM1                                | Asialo Ganglio-N-Tetraosylceramid 1                   |
| ATP                                       | Adenosintriphosphat                                   |
| ATPasen                                   | Adenosintriphosphatase                                |
| Bcl                                       | B-Cell Lymphoma                                       |
| C57BL/6                                   | C57 Black 6   |
| CA  | Carboanhydrase  |
| CD  | Cluster of Differentiation                            |
| CFDA-SE                                   | Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester        |
| CFSE                                      | 5-Carboxyfluorescein N-Succinimidyl Ester             |
| c-MYC <sub>a</sub>                        | Apparent kranke c-MYC-tragende Maus                   |
| c-MYC <sub>ina</sub>                      | Inapparente c-MYC-tragende Maus                       |
| c-MYC <sub>ina</sub> + NaHCO <sub>3</sub> | Inapparente c-MYC-tragende Maus + NaHCO <sub>3</sub>  |
| CPD                                       | Proliferation Dye eFluor® 450                         |
| CpG                                       | Desoxycytidin – Phosphorsäure – Desoxyguanosin        |
| CTL                                       | Cytotoxic T-Lymphocyte                                |
| CTLA                                      | Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4           |
| CXCL                                      | CXC-Motiv-Ligand                                      |
| CXCR3                                     | CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 3                          |
| DMSO                                      | Dimethylsulfoxid                                      |
| DNA                                       | Desoxyribonukleinsäure                                |
| DNAM-1                                    | DNAX Accessory Molecule-1                             |
| DZ  | Dendritische Zelle                                    |
| EDTA                                      | Ethylendiamintetraessigsäure                          |
| EMT                                       | Epithelial-to-Mesenchymal-Transformation              |
| ERK                                       | Extracellular-signal Related Kinase                   |
| FACS                                      | Fluorescence-Activated Cell Sorting                   |
| FasL                                      | Fas-Ligand  |
| FcγRIII                                   | Immunoglobulin Gamma Fc Region Receptor III           |
| FKS                                       | Fetales Kälberserum                                   |
| FMO                                       | Flourescence Minus One                                |
| FoxP3                                     | Forkhead-Box-Protein P3                               |
| FSC                                       | Forward Scatter                                       |
| GLUT                                      | Glukosetransporter                                    |
| GM-CSF                                    | Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor  |
| Grz A                                     | Granzym A   |
| Grz B                                     | Granzym B   |
| HEPES                                     | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure |
| HIF                                       | Hypoxia-inducible Factors                             |
| i.p.                                      | intraperitoneal                                       |
| IC Fixation Buffer                        | Intracellular Fixation Buffer                         |
| iDCs                                      | immature Dendritic Cell                               |
| IDO                                       | Indolamin-2-3-Dioxygenase                             |
| IFN-γ                                     | Interferon Gamma                                      |
| Igλ                                       | Immunglobulin Lambda                                  |
| IL  | Interleukin   |

## Abkürzungsverzeichnis

|                    |  |
|--------------------|--|
| I-TAC              | Interferon-inducible T-Cell Alpha Chemoattractant                |
| JNK                | C-Jun N-terminale Kinase   |
| Ki-67              | Kiel-67  |
| KLR                | Killerzellen-лектinähnliche-Rezeptor                             |
| LAG-3              | Lymphocyte-Activation Gene 3                                     |
| LAMP               | Lysosomen-assoziiertes Membranprotein                            |
| LK                 | Lymphknoten  |
| LPS                | Lipopolysaccharide   |
| LT- $\alpha$       | Lymphotoxin- $\alpha$  |
| M2-M $\Phi$        | M2-polarisierte Makrophagen                                      |
| MACS               | Magnetic Cell Separation   |
| MAPK               | Mitogen-Activated Protein Kinase                                 |
| MCT                | Monocarboxylattransporter  |
| MDR                | Multi-Drug-Resistant   |
| MDSC               | Myeloid-Derived Suppressor Cell                                  |
| MEM                | Minimum Essential Medium   |
| MFI                | Mean Fluorescence Intensity                                      |
| MHC                | Major Histocompatibility Complex                                 |
| MIG                | Monokine induced by Gamma-Interferon                             |
| mM                 | Millimolar   |
| mTOR               | Mammalian Target of Rapamycin                                    |
| NaHCO <sub>3</sub> | Natrium-Bikarbonat   |
| NBC                | Na <sup>+</sup> /HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -Transporter      |
| NCR                | Natürlicher Zytotoxizitätsrezeptor                               |
| NF- $\kappa$ B     | Nuclear Factor 'Kappa-Light-Chain-Enhancer' of Activated B-Cells |
| NHE1               | Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -Exchanger 1                     |
| NKC                | NK-Rezeptor-Komplex  |
| NKT                | Natürliche Killer-T-Zelle  |
| NKZ                | Natürliche Killerzelle   |
| OTC                | Over-The-Counter   |
| p38                | p38-mitogenaktivierte Proteinkinase                              |
| PAMP               | Pathogen-Associated Molecular Pattern                            |
| PBS                | Phosphate Buffered Saline  |
| PD-1               | Programmed Cell Death Protein 1                                  |
| pERK               | phosphoryliertes ERK   |
| PGE2               | Prostaglandin E2   |
| p-GP               | p-Glykoprotein   |
| pH <sub>e</sub>    | Extrazellulärer pH   |
| pH <sub>i</sub>    | Intrazellulärer pH   |
| PI3K               | Phosphoinositid-3-Kinase   |
| pJNK               | phosphoryliertes JNK   |
| PMA                | Phorbol-12-Myristat-13-Acetat                                    |
| pp38               | phosphoryliertes p38   |
| PPI                | Protonenpumpeninhibitor  |
| Prf                | Perforin   |
| PRR                | Pattern Recognition Receptor                                     |
| RPMI               | Roswell-Park-Memorial-Institute                                  |
| RT                 | Raumtemperatur   |
| s.c.               | subkutan   |
| SAPK               | Stress-Activated Protein Kinase                                  |
| SCID               | Severe Combined Immunodeficiency                                 |
| SEM                | Standard Error of the Mean                                       |
| sNKG2D-L           | soluble NKG2D-Ligand   |
| SSC                | Side Scatter   |
| TAF                | Tumorassoziierte Fibroblasten                                    |
| TAM                | Tumorassoziierte Makrophagen                                     |

## Abkürzungsverzeichnis

|                       |  |
|-----------------------|--|
| TGF- $\beta$ .....    | <i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> |
| Th1 .....             | <i>Typ1-T-Helferzelle</i>                            |
| Th17 .....            | <i>Typ17-T-Helferzelle</i>                           |
| Th2 .....             | <i>Typ2-T-Helferzelle</i>                            |
| TLR .....             | <i>Toll-Like-Rezeptor</i>                            |
| TNF.....              | <i>Tumornekrosefaktor</i>                            |
| TRAIL.....            | <i>TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand</i>         |
| Tregs.....            | <i>Regulatorische T-Zelle</i>                        |
| TZR .....             | <i>T-Zell-Rezeptor</i>                               |
| u-PA.....             | <i>Urokinase-Plasminogen-Aktivator</i>               |
| V. Cava Inferior..... | <i>Vena Cava Inferior</i>                            |
| VEGF.....             | <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>            |
| WT.....               | <i>Wildtyp</i>                                       |

# DANKSAGUNG

---

Allem voran möchte ich meinen Eltern und meiner Familie danken; dafür, dass sie mich stets in allen meinen Plänen und Ideen unterstützt haben. Ohne Euch wäre all das nicht möglich gewesen.

Ein großer Dank gilt natürlich meinem Doktorvater und Betreuer meiner Arbeit Prof. Ralph Mocikat, der stets ansprechbar war, sich intensiv mit der Arbeit auseinandergesetzt hat und das Forschungsthema als solches überhaupt erst ermöglicht hat. Die Zeit im Labor hat mich wissenschaftlich sowie persönlich stark bereichert und ich werde diese Erfahrung für meinen weiteren Lebensweg mitnehmen.

Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Betreuerin Dr. Nina Deppisch bedanken, die ihre Expertise mit stets sehr konstruktiven Vorschlägen und innovativen Ideen eingebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt auch meinen Kollegen. Ich möchte meinem direkten Partner und Mitdoktoranden Josia Fauser danken, dass er alle Höhen und Tiefen dieses Lebensabschnittes mit mir gegangen ist. Danke auch an Fatima Ahmetlic, die als stets froher Lebensgeist das Labor zu einem zweiten Zuhause gemacht hat. Ein Dank gilt auch Carolin Flessner, für die freundliche Zusammenarbeit und ausgelassene Kletterabende nach dem Labor.

Besonders würdigen möchte ich auch Nadine Hömberg, die mit ihrer außerordentlichen zwischenmenschlichen Art wie eine zweite Betreuerin für mich war und oft dabei half, meine Arbeit zu realisieren. Danke auch an Albert Geishauser, der mir bei Tierversuchen oft entscheidend ausgeholfen hat.

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des Tierstalles für die stets kooperative und produktive Zusammenarbeit bedanken, sowie bei der „Plattform Monoklonale Antikörper“ für die großzügige Bereitstellung von notwendigen Antikörpern.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei meinen Freunden, die mir stets verständnisvoll zur Seite standen und mich durch dieses Jahr begleitet haben.