

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Forschungsabteilung der Klinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde

Antitumorale und immunmodulatorische Aktivität von anti-EGFR  
Therapeutika beim Ovarialkarzinom

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Sonja Benders  
aus Essen  
2022

# DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT  
DUISBURG  
ESSEN

*Offen im Denken*

ub | universitäts  
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

**DOI:** 10.17185/duepublico/77024

**URN:** urn:nbn:de:hbz:465-20230405-085637-3



Dieses Werk kann unter einer Creative Commons Namensnennung - Nicht-kommerziell - Weitergabe unter gleichen Bedingungen 4.0 Lizenz (CC BY-NC-SA 4.0) genutzt werden.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. nat. S. Brandau  
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. P. Buderath

Tag der mündlichen Prüfung: 5. September 2022

## Publikationen:

### Reactivity of NK Cells Against Ovarian Cancer Cells Is Maintained in the Presence of Calcium Phosphate Nanoparticles

Antonio Hrvat 1, Mathias Schmidt 1, Martin Obholzer 1, Sonja Benders 1, Sebastian Kollenda 2, Peter A Horn 3, Matthias Epple 2, Sven Brandau 1 4, Nina Mallmann-Gottschalk 1 5

1Experimental and Translational Research, Department of Otorhinolaryngology, University Hospital Essen, Essen, Germany.

2Inorganic Chemistry and Center for Nanointegration Duisburg-Essen (CeNIDE), University of Duisburg-Essen, Essen, Germany.

3Institute for Transfusion Medicine, University Hospital Essen, Essen, Germany.

4German Cancer Consortium, Partner Site Essen-Düsseldorf, Essen, Germany.

5Department of Gynecology and Obstetrics, University Hospital Essen, Essen, Germany.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 Ovarialkarzinom .....	8
1.1.1 Inzidenz, Epidemiologie, Ätiologie.....	8
1.1.2 Risikofaktoren .....	9
1.1.3 Klassifikation des Ovarialkarzinoms.....	10
1.1.4 Klinik und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms .....	10
1.1.5 Prognosefaktoren.....	13
1.1.6 Aszites .....	13
1.1.7 Therapie.....	14
1.2 Immunologie beim Ovarialkarzinom .....	17
1.2.1 EGF-Rezeptor.....	17
1.2.2 Cetuximab .....	18
1.2.3 Natürliche-Killerzellen (NK-Zellen).....	20
1.2.4 Natürliche Zytotoxizität und ADCC.....	22
1.3 Calciumphosphat-Nanopartikel .....	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	26
2 MATERIAL UND METHODEN.....	28
2.1 Methoden .....	28
2.1.1 Tumorzellkultivierung.....	28
2.1.2 NK-Zell-Isolation .....	28
2.1.3 Durchflusszytometrie .....	29
2.1.4 CD107a-Degranulationsassay .....	30

2.1.5	Bestimmung der MHC-I-, EGFR- und MICA-Expression.....	32
2.1.6	Fluoreszenzmikroskopie.....	32
2.1.7	Nanopartikel .....	33
2.1.8	Transfektion.....	34
2.1.9	Modulation der MICA Expression durch adenovirale Transduktion .....	35
2.1.10	Detektion von IgG-Antikörpern im Aszites durch ELISA .....	35
2.1.11	Proteinchromatografie zur Isolation von Antikörpern aus Aszites.....	36
2.1.12	Coomassie-Färbung zum Nachweis von IgG-Antikörpern .....	37
2.2	Material.....	38
2.2.1	Verwendete Antikörper, Isotypen und RNA .....	38
2.2.2	Aszites .....	39
2.2.3	Verwendete Nanopartikel.....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>40</b>
3.1	NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen und Möglichkeiten ihrer Beeinflussung .....	40
3.1.1	Charakterisierung humaner Ovarialkarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer MHC-I-, EGFR- und MICA-Expression.....	40
3.1.2	Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber humanen Ovarialkarzinomzellen .....	42
3.1.3	Möglichkeiten zur Modulation zytotoxischer NK-Zell-Funktionen.....	43
3.1.3.1	Hochregulation von MIC A.....	43
3.1.3.2	Modulation der MHC-I Expression.....	45
3.1.3.2.1	Modulation der NK-Toxizität durch anti-MHC-I-Antikörper .....	45
3.1.3.2.2	Modulation der MHC-I-Expression durch inhibitorische RNA (siRNA) mittels Transfektion .....	47
3.1.3.3	Einsatz funktionalisierter Calciumphosphat Nanopartikel .....	50
3.1.3.3.1	Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Nanopartikeln in Tumorzellen.....	50
3.1.3.3.2	Einfluss von Calciumphosphat-Nanopartikel auf die NK-Zellaktivität.....	52

3.1.3.3.3	NK-Zell-Zytotoxizität nach Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit anti-MHC-I-siRNA-enthaltenden Calciumphosphat-Nanopartikel .....	54
3.2	Einfluss von malignem Aszites auf die immunologische Aktivität der NK-Zellen.....	57
3.2.1	Auswirkung von azellulärem Aszites auf die Zytotoxizität von NK-Zellen .....	57
3.2.2	Analyse der Aszitesflüssigkeit auf Antikörper der Klasse IgG .....	58
3.2.2.1	Depletion und Eluierung von IgG-Antikörpern aus verschiedenen Aszitesproben	59
3.2.2.2	Auswirkung der eluierten Antikörper auf die NK-Zytotoxizität .....	61
3.2.3	Modulation der Aszites-vermittelten NK-Zell-Inhibition durch Calciumphosphat-Nanopartikel.....	62
4	DISKUSSION .....	65
4.1	Möglichkeiten der NK-Zell Modulation .....	65
4.2	Auswirkung von malignem Aszites auf die NK-Zell-Aktivität .....	69
4.3	Einsatz von Calciumphosphat-Nanopartikel als therapeutisches Tool .....	73
4.3.1	Calciumphosphat-Nanopartikel als Transfektionsreagenz .....	73
4.3.2	Interaktion von Ca-P-Nanopartikel und NK-Zellen .....	78
4.3.3	Interaktion von Ca-P-Nanopartikeln in malignem Aszites.....	81
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	83
6	LITERATURVERZEICHNIS .....	84
7	TABELLARISCHER ANHANG .....	94
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	100

9	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	102
10	DANKSAGUNG.....	104
11	LEBENS LAUF.....	105

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Ovarialkarzinom

### 1.1.1 Inzidenz, Epidemiologie, Ätiologie

Das **Ovarialkarzinom** ist das dritthäufigste Genitalmalignom und liegt mit 5,2 % (s. Abb. 1) an fünfter Stelle der häufigsten Tumore bei Frauen (Robert Koch-Institut and e.V., 2019). Dabei beläuft sich das Lebenszeitrisiko in Bezug auf die Erkrankung an einem malignen Ovarialtumor auf 1,3 %. Die relative 5-Jahresüberlebensrate (5-JÜR) wird mit 43 % angegeben (Robert Koch-Institut and e.V., 2019).

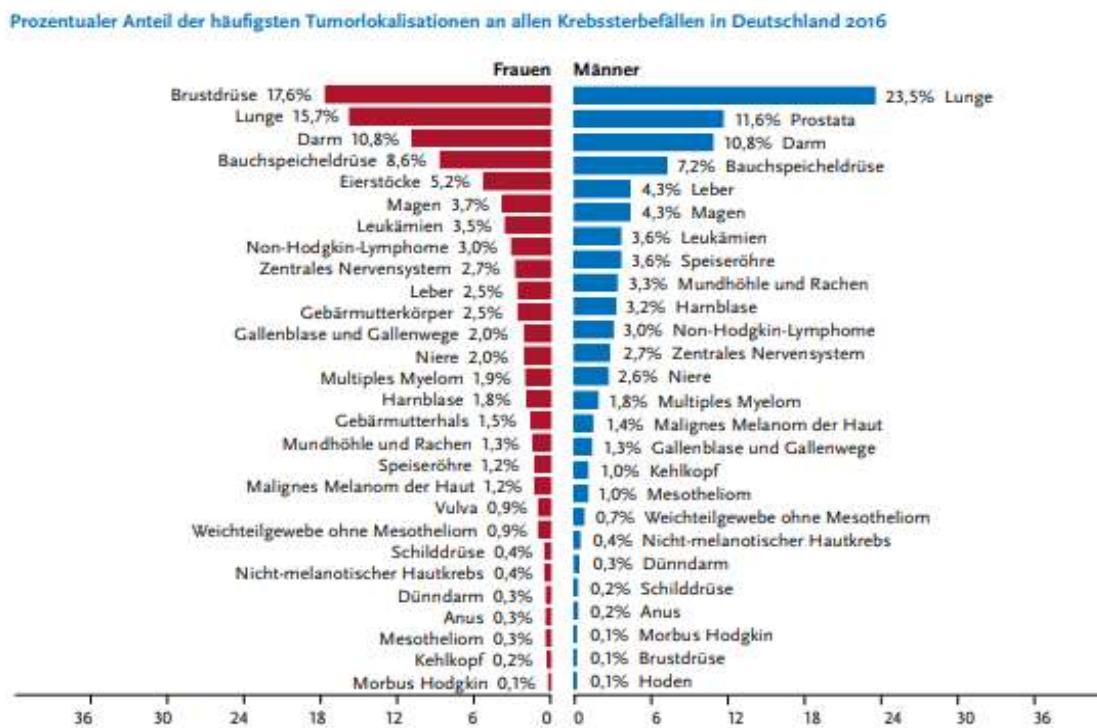


Abb. 1

Gezeigt ist die häufigste Tumorlokalisation bei Frauen und Männern. Die Daten werden als prozentuale Anteile im Balkendiagramm, bezogen auf alle Tumorerkrankungen dargestellt. Das Ovarialkarzinom liegt dabei mit 5,2 % an der fünften Stelle (Robert Koch-Institut and e.V., 2019).

Das Ovarialkarzinom hat oftmals einen symptomarmen Verlauf und wird daher häufig erst in einem späten Stadium diagnostiziert. Ca. 76 % aller Ovarialkarzinom befinden sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in den fortgeschrittenen FIGO-Stadien III-IV (s. Abb. 2) (Robert Koch-Institut and e.V., 2019).





Abb. 2

Gezeigt wird das Tumorstadium, welches bei der Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms vorliegt. Die Abbildung verdeutlicht, dass sich die meisten Ovarialkarzinome in einem schon stark fortgeschrittenen Stadium (Stadium III-IV) befinden (Robert Koch-Institut and e.V., 2019).

Die Möglichkeiten zur frühzeitigen Erkennung eines Ovarialkarzinoms sind leider begrenzt. Weder Tumormarkerbestimmung noch Vaginalsonographie stellen geeignete bzw. ausreichende Screening-Methoden dar.

Die eigentliche Ätiologie des Ovarialkarzinoms ist unklar, lediglich einige Risikofaktoren sind mit einem gehäuften Auftreten eines Ovarialkarzinoms korreliert.

### 1.1.2 Risikofaktoren

Es gibt einige **Risikofaktoren**, die die Entstehung eines Ovarialkarzinoms begünstigen. Entscheidende Faktoren für das Auftreten von Ovarialkarzinomen scheinen mit Ereignissen im Reproduktionstrakt zusammenzuhängen. Dabei sind vor allem die Anzahl der Follikelrupturen mit den zusammenhängenden Reparaturmechanismen an der Ovarialoberfläche von Relevanz. Auf Basis dieser Korrelation ist die Einnahme oraler Kontrazeptiver der wichtigste protektive Faktor (Kaufmann et al., 2012). Demnach konnte auch eine Sterilisation, in Form einer Tubenligatur als auch Parität und Laktation als protektiver Faktor evaluiert werden. Gegensätzlich dazu besteht bei Einnahme einer Hormonersatztherapie (Östrogen- oder Östrogen-Gestagen-Therapie) sowie bei Infertilität und Nulliparität ein erhöhtes Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken (Onkologie, 2019). Zudem zeigte sich bei 5-10 % der Ovarialkarzinome ein Zusammenhang mit genetischer Disposition. Ein erhöhtes Risiko zu erkranken, spiegelt sich in einer familiären Häufung wider. Dabei scheinen Genmutationen, welche sich auf Chromosom 17 (BRCA-Gen 1) und 13 (BRCA-Gen 2) befinden, ein prädisponierender Faktor zu sein (Kaufmann et al., 2012).

### 1.1.3 Klassifikation des Ovarialkarzinoms

Die WHO teilt das Ovarialkarzinom anhand ihrer Histologie in **9 verschiedene Gruppen** ein. Bei einigen der 9 Gruppen gibt es zudem noch eine weitere Differenzierung des histologischen Befundes. Im Folgenden werden die verschiedenen Hauptgruppen aufgelistet und kurz erläutert.

Die erste Gruppe geht aus dem **Oberflächenepithel** hervor und wird daher als epithelialer Tumor beschrieben. Da das Oberflächenepithel ein Abkömmling des Zölomepithels darstellt, bilden diese ein einheitliches histologisches Bild und werden als Müller-Tumore zusammengefasst. Die epithelialen Tumore bilden mit ca. 90 % die häufigste Gruppe der malignen Ovarialtumore. Meist wird daher die histologische Beschreibung auf epithelial und nicht-epitheliale Tumore beschränkt. Dabei kommen epitheliale seröse und muzinöse Ovarialkarzinome am häufigsten vor (Böcker et al., 2012).

Als zweite Gruppe werden die **Stromatumore** beschrieben. Da diese sowohl aus Zölomepithel als auch aus dem endokrinen aktiven Stroma des Ovars hervorgehen, wird diese Gruppe gesondert beschrieben. Über die Hälfte dieser Tumore sind hormonaktiv und in der Lage, Steroidhormone zu produzieren. Dadurch kann ein Hyperöstrogenismus sowie ein Hyperandrogenismus auftreten. Meist gehen diese Tumore im Vergleich zu den epithelialen Tumoren mit einer besseren Prognose einher.

Die **Lipidzelltumore** werden als dritte Gruppe aufgeführt. Das histologische Bild zeigt sich jedoch nicht so homogen wie bei den ersten beiden Gruppen. Meist weisen die Tumore dieser Gruppe eine vermehrte Bildung von Androgenen auf, welches mit einer entsprechenden Symptomatik einhergeht. Die vierte Gruppe, die **Keimzelltumore** sind mit 25 % die zweithäufigste Gruppe der klinisch vorkommenden Tumore. Der Großteil dieser Tumore ist gutartig, sie können jedoch in jedem Lebensalter auftreten. Lediglich 3-5 % dieser Gruppe zeigen maligne Entartung.

Die letzten fünf Gruppen werden durch die gemischten Keimzelltumore und Stromatumore (V), die bindegewebigen, nicht ovarspezifischen Tumore (VI), die unklassifizierten Tumore (VII), sowie die sekundär metastatischen Tumore (VIII) und die tumorähnlichen Veränderungen (IX) charakterisiert (Kaufmann et al., 2012).

### 1.1.4 Klinik und Stadieneinteilung des Ovarialkarzinoms

Die **Symptome des Ovarialkarzinoms** treten meist erst im Verlauf der Erkrankung auf. Jedoch sind diese meist unspezifisch und zeigen sich anfangs in Form von Völlegefühl, unklaren abdominellen Schmerzen oder Blähungen. In fortgeschritteneren Stadien kommt es auch zur Zunahme des Bauchumfangs durch die Bildung von malignem Aszites (Kaufmann et al., 2012).

Die Präsentation von weiteren Symptomen ist mit der **Ausbreitung des Ovarialkarzinoms** assoziiert. Dabei breitet sich das Ovarialkarzinom zuerst per continuitatem aus, das bedeutet die umgebenden Strukturen werden von den Tumorzellen infiltriert. Anschließend erfolgt die

Ausbreitung des Karzinoms entlang des Peritoneums und gegebenenfalls über die Peritonealflüssigkeit (Aszites) in das Abdomen. Das führt vor allem zu Befall von Omentum majus und der Appendix. Eine frühe lymphogene Metastasierung erfolgt in die retroperitonealen und paraaortocavalen Lymphknoten, wodurch okkulte Lymphknotenmetastasen bei ca. 30% der Patientinnen in frühen Tumorstadien diagnostiziert werden können (Onkologie, 2019). Primäre hämatogene Metastasen sind eher selten und finden sich bei ca. 2-3% der Patientinnen. Häufiger sind jedoch sekundäre Metastasen im Krankheitsverlauf vorzufinden. Die Absiedlungen befinden sich zumeist intrahepatisch oder pulmonal, wodurch sich auch ein sekundärer Pleuraerguss präsentieren kann (Kaufmann et al., 2012).

In Bezug auf die **Klassifikation des Ovarialkarzinoms** erfolgt eine Unterscheidung zwischen zwei verschiedenen Systemen. Zum einen ist es möglich, die Ausbreitung des Tumors nach klassischer **TNM-Klassifikation** zu beschreiben. Jedoch wird bei dem Ovarialkarzinom die **FIGO-Einteilung** (Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) bevorzugt, welche sich nach intraoperativem, makroskopischem sowie histologischem Befund richtet (siehe Tab.1).

	FIGO	Definition
TX		Primärtumor nicht bekannt, keine Angaben möglich
T0		Kein Anhalt für einen Tumor
T1	I	Tumor auf die Ovarien oder Tuben beschränkt
T1a	IA	auf ein Ovar (Kapsel intakt) oder eine Tube (Serosa intakt) beschränkt, Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1b	IB	Befall beider Ovarien (Kapsel intakt) oder beider Tuben (Serosa intakt), Ovar- oder Tubenoberfläche tumorfrei, negative Spülzytologie
T1c	IC	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit Nachweis einer der folgenden Punkte:
T1c1	IC1	iatrogene Kapsel- (Serosa-)ruptur
T1c2	IC2	präoperative Kapsel- (Serosa-)ruptur oder Tumor auf der Ovar- oder Tubenoberfläche
T1c3	IC3	maligne Zellen im Ascites oder in der Spülzytologie nachweisbar
T2	II	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung in das kleine Becken oder primäres Peritonealkarzinom
T2a	IIA	Ausbreitung und/oder Tumorimplantate auf Uterus und/oder Tuben und/oder Ovarien
T2b	IIB	Ausbreitung auf weitere intraperitoneale Strukturen im Bereich des kleinen Beckens

T3 und/oder N1	III	Tumor befällt ein oder beide Ovarien oder Tuben oder primäres Peritonealkarzinom mit zytologisch oder histologisch nachgewiesener Ausbreitung außerhalb des kleinen Beckens und/oder retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3		Nur retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
N1a	IIIA1i	Metastasen ≤ 10 mm
N1b	IIIA1ii	Metastasen > 10 mm
T3a jedes N	IIIA2	mikroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3b jedes N	IIIB	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens ≤ 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen
T3c jedes N	IIIC	makroskopische extrapelvine Ausbreitung auf das Peritoneum außerhalb des kleinen Beckens > 2 cm mit oder ohne retroperitoneale Lymphknotenmetastasen; schließt eine Ausbreitung auf die Leberkapsel und/oder die Milzkapsel ein
M1	IV	Fernmetastasen mit Ausnahme peritonealer Metastasen
M1a	IVA	Pleuraerguß mit positiver Zytologie
M1b	IVB	Parenchymale Metastasen der Leber und/oder der Milz, Metastasen in außerhalb des Abdomens gelegenen Organen (einschließlich inguinaler Lymphknotenmetastasen und/oder anderer außerhalb des Abdomens gelegener Lymphknotenmetastasen)

Tab. 1

Dargestellt ist sowohl die TNM- als auch die FIGO-Klassifikation von Tumoren des Ovars. Die Einteilung richtet sich nach der Ausdehnung des Tumors im Gewebe, sowie dem Befall der Lymphknoten. (Onkologie, 2019)

Die FIGO-Stadien lassen sich zu Outcome und 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR) korrelieren. Im FIGO I-Stadium beträgt die 5-JÜR nach operativen Staging ca. 90 %. Wenn sich der Tumor bereits im FIGO III-Stadium befindet, sinkt die 5-JÜR in Abhängigkeit vom Lymphknotenbefall auf ungefähr 35 % (Krauß et al., 1997).

Trotz leitliniengerechter Therapie kommt es in 50-60% der Fälle zu einem Rezidiv (Petri and Stranz, 2007). Diese Rezidive lassen sich kalendarisch in platin-refraktäre bzw. -resistente oder platin-sensible Ovarialkarzinome unterteilen. Dabei liegt der Cut-off bei 6 Monaten nach Abschluss der platinhaltigen Erstlinienchemotherapie. Jedoch wird im Verlauf diese Unterteilung nicht mehr ausreichen, um die Rezidivpopulation zu beschreiben. Daher wird neben dem therapiefreien Intervall auch die Patientinnenpräferenz, Alter und Belastbarkeit sowie genetische Faktoren eine Rolle in der Therapieentscheidung spielen (Onkologie, 2019).

### 1.1.5 Prognosefaktoren

Als **Prognosefaktoren** für den Verlauf des Ovarialkarzinoms können mehrere Modalitäten betrachtet werden. Sowohl klinische, histologische als auch tumorbiologische Faktoren beeinflussen den Verlauf der Tumorerkrankung. Ebenfalls haben das Alter der Patientinnen, welches bei >50 Jahren mit einer ungünstigen Prognose einhergeht, und deren Allgemeinzustand eine tragende Rolle (Staebler and Mayr, 2017). Das entscheidende Kriterium stellt jedoch das **Stadium** dar, in dem sich der Tumor bei Diagnosestellung befindet. Somit zeigen die Stadien FIGO I und II eine deutlich bessere postoperative Prognose als FIGO III und IV. Die FIGO-Stadien beeinflussen zudem die Relevanz der anderen Prognosefaktoren. Als klinischer Faktor wird vor allem der **postoperative Tumorrest** als Maß für die Prognose betrachtet. Dabei zeigt sich bei mikroskopischen Resten eine bessere Prognose als bei makroskopischen Resttumor. Daher sollte ein postoperativer Tumorrest <1cm angestrebt werden. Dieser Faktor ist vor allem bei den fortgeschrittenen Stadien entscheidend. Insgesamt ist die leitliniengerechte Therapie ein entscheidender Parameter für den Verlauf des Ovarialkarzinoms (Onkologie, 2019). Der **histologische Subtyp** scheint vor allem in den frühen Stadien relevant zu sein. Jedoch wird die prognostische Bedeutung noch diskutiert, wobei ein muzinöses fortgeschrittenes Stadium mit einer ungünstigeren Prognose einhergeht (Du Bois et al., 2009). Das **Grading**, bestehend aus tumorbiologischen Faktoren wie proliferativen Parametern, bestimmt ebenfalls die Prognose des Ovarialkarzinoms. Dazu gehören der Zellanteil, der sich in der S-Phase befindet, die Ploidität sowie der Proliferationsmarker Ki-67. Ebenfalls weisen das Vorkommen des Onkogen Her2/neu (Slamon et al., 1989), als auch die Mutation des Tumorsuppressorgens p53, auf eine Korrelation zu einer schlechten Prognose hin. Weitere prognostische Marker scheinen die präoperative Aszitesmenge sowie der retroperitoneale Lymphknotenbefall zu sein, welche allerdings eher eine untergeordnete Rolle spielen (Kaufmann et al., 2012).

### 1.1.6 Aszites

Aszites ist eine Ansammlung von freier Flüssigkeit innerhalb der mit Peritoneum ausgekleideten Bauchhöhle. Dabei kann diese Flüssigkeit durch verschiedene Prozesse entstehen. Die verschiedenen **Aszitesformen** richten sich nach den Ursachen der Entstehung. Daher werden folgende Gruppen unterschieden: portaler Aszites, kardialer Aszites, maligner Aszites, entzündlicher Aszites, pankreatogener Aszites und andere seltene Formen. Die Therapie des Aszites richtet sich nach Ätiologie und Pathogenese der zugehörigen Grunderkrankung. Pathogenetisch spielen bei der Entstehung von Aszites sog. Starling-Kräfte eine Rolle, die vom hydrostatischen Druck (v.a. abhängig vom Blutdruck) und dem onkotischen Druck abhängen. Letzterer wird vor allem durch den Proteingehalt im extravasalen Raum bestimmt. Steigt entweder der hydrostatische Druck im

Gefäßsystem oder der onkotische Druck im Interstitium, wird der Flüssigkeitseinstrom in die Peritonealhöhle begünstigt.

Das Ovarialkarzinom begünstigt durch seine intraperitoneale Lage und Ausbreitung per continuitatem die Entstehung von malignem Aszites. Zusätzlich bewirkt die beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom entstehende Peritonealkarzinose die Verlegung der Lymphabflussgefäße, wodurch der Einstrom von Lymphflüssigkeit in die Bauchhöhle weiter begünstigt wird (Gerok, 2013). Durch die Flüssigkeit im Bauchraum entsteht für die Immunzellen eine besondere Umgebung, die vor allem durch ein proinflammatorisches und immunsuppressives Mikromilieu gekennzeichnet ist (Matte et al., 2012).

### 1.1.7 Therapie

In fortgeschrittenen Stadien besteht der **therapeutische Goldstandard** in einer radikalen Tumorchirurgie mit vollständiger Resektion (makroskopische R0-Resektion) aller Tumorabsiedlungen. Der postoperativ verbleibende Tumorrest stellt dabei den bedeutsamsten prognostischen Faktor dar: Bei makroskopischer Tumorfreiheit wird die 5-JÜR mit 60% in fortgeschrittenen Stadien angegeben und sinkt auf 20% bei postoperativ vorhandenem makroskopischen Tumorrest, siehe Abb.3 (Du Bois et al., 2009; Kaufmann et al., 2012).

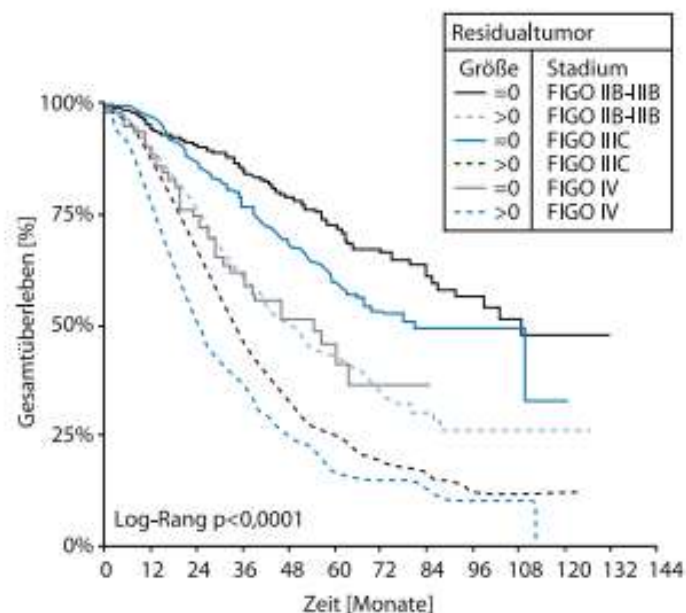


Abb. 3

Gezeigt wird das Gesamtüberleben [%] beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit der Stadien FIGO IIB-IV (durchgezogene Linien) und postoperativem Tumorrest (gestrichelte Linien). Höhere Tumorstadien gehen dabei mit einem geringeren Überleben einher (vgl. durchgezogene schwarze Linie versus blaue bzw. graue Linie). Bei verbleibendem postoperativem Tumorrest verringert sich das Gesamtüberleben signifikant in allen fortgeschrittenen Stadien (gestrichelte Linien). Demnach beträgt z.B. im Stadium FIGO III C die 5-JÜR ca.

60% (blau durchgezogen) bei postoperativer makroskopischer Tumorfreiheit, bei nicht vollständiger Resektion sinkt die 5-JÜR im selben Stadium auf ca. 25% (schwarz gestrichelt) (Du Bois et al., 2009; Kaufmann et al., 2012).

Bis auf die Diagnose in sehr frühen Stadien schließt sich zur Konsolidierung der Tumorresektion eine adjuvante Platin-Taxan-haltige Chemotherapie gegebenenfalls in Kombination mit zielgerichteten Substanzen an.

In den frühen FIGO-Stadien (I-IIA) sollte eine **Staging-Operation** durchgeführt werden. In diesem Krankheitsstadium beschränkt sich die Ausbreitung des Karzinoms auf das kleine Becken. Die Operation wird als Laparotomie durchgeführt und beinhaltet neben der Inspektion, Palpation und Peritonealzytologie auch die Entnahme von Biopsien und die Exstirpation von Organen und Lymphknoten. Durch die Ausbreitungsdynamik des Tumors wird die beidseitige Adnexexstirpation, Hysterektomie, Omentektomie und Appendektomie, sowie die paraaortale und pelvine Lymphonodektomie angestrebt. Diese Strukturen sind besonders für metastatische Absiedlungen gefährdet und werden zudem benötigt, um ein adäquates Staging zu gewährleisten.

Wie bereits beschrieben, stellt die **Chemotherapie** neben der operativen Therapie ein zentraler Bestandteil des Behandlungskonzeptes dar. Mitte des 20. Jahrhunderts war die **Alkylanzientherapie** die Standardtherapie. Danach wurde diese Mitte der 1970er Jahre von Cisplatin ersetzt. Als anschließend in den 1990er Jahren Paclitaxel auch zu Therapie zugelassen wurde, konnte durch die Kombination mit Cisplatin eine Verbesserung der Überlebenszeit und der Remission erzielt werden. Jedoch zeigt Carboplatin ein deutlich geringeres Toxizitätsspektrum, sowie eine bessere Verträglichkeit bei gleicher Effektivität als Cisplatin und wird daher heute zur Kombinationstherapie mit **Paclitaxel** bei fortgeschrittenen Stadien verwendet. In frühen Stadien wird Carboplatin als Monotherapie angewendet. Diese Therapie ist bis heute der Standard in der Chemotherapie und erzielt gute Ergebnisse mit eingeschränktem Nebenwirkungsprofil (Onkologie, 2019; Ozols et al., 2003).

Das therapeutische Ansprechen hängt allerdings von der grundsätzlichen Chemosensitivität ab: Ca. 2/3 der Ovarialkarzinome zeigen ein gutes chemotherapeutisches Ansprechen und gelten als platin-sensibel. 1/3 der Ovarialkarzinome zeigen primäre Platinresistenz, sprechen nicht oder nur in geringem Umfang auf eine platinhaltige Chemotherapie an und haben eine ungünstige Prognose. Des Weiteren ist die postoperative Tumorgröße für die Behandlungseffektivität von Bedeutung. Umso kleiner und proliferativer die verbliebenen Tumorreste sind, umso effektiver wirkt die Chemotherapie. Durch optimale Bedingungen kann sogar gelegentlich eine Komplettremission erreicht werden.

Trotz initialer, meist guter Chemosensibilität zeigen ca. 80% aller fortgeschrittenen Ovarialkarzinome ein Rezidiv. Daher konzentrierte sich die Forschung in den letzten Jahren auf die Entwicklung innovativer zielgerichteter Therapien. Zunächst wurden in erster Linie **therapeutische**

**Antikörper** entwickelt. Der Wichtigste stellt bislang **Bevacizumab** (Avastin®) dar. Er zählt zu den anti-VEGF-Antikörpern und führt in Kombination mit einer Chemotherapie zu einer günstigen Prognose bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen (Garcia et al., 2005). Da das progressionsfreie sowie das Gesamtüberleben in Hochrisikogruppen verlängert und die Remission im Vergleich zur Standardtherapie erhöht wird (Perren et al., 2011), ist er für die Primärtherapie in fortgeschrittenen Ovarialkarzinomstadien zugelassen sowie für die Rezidivtherapie bei platinresistenten und platinresistenten Ovarialkarzinom. Er wird heutzutage standardmäßig gemeinsam zu dem Goldstandard mit Paclitaxel und Carboplatin eingesetzt (Onkologie, 2019) und als Erhaltungstherapie für insgesamt 12 Monate fortgeführt. Ein weiterer wichtiger Schritt war die Entwicklung sog. **PARP-Inhibitoren** (Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren). Die Inhibition von PARP verhindert in den Tumorzellen eine Reparatur von DNA-Schäden, wodurch es zu Doppelstrangbrüchen kommt. Bei bestimmten Mutationen, insbesondere bei BRCA-1 und -2 Mutationen, können diese Doppelstrangbrüche nicht repariert werden und führen somit zum Tod der Zelle. Somit sind BRCA-Mutationen eine Voraussetzung für die Wirkung von PARP-Inhibitoren. Sie können als Keimbahnmutationen auftreten und zu einer genetischen Prädisposition für Ovarialkarzinome führen oder spontan als somatische Mutationen in Ovarialkarzinomen auftreten. Seit 2019 ist Olaparib bei Nachweis einer Keimbahnmutation für BRCA-1 und -2 in der Primärtherapie des serösen (high-grade), platinresistenten Ovarialkarzinoms im Stadium III/IV als Erhaltungstherapie nach platinhaltiger Chemotherapie und in der Rezidivsituation zugelassen (Onkologie, 2019). Neuere Daten weisen darauf hin, dass unter Umständen auch Immuncheckpoint-Inhibitoren wie der **Anti-PD-1-Antikörper** Pembrolizumab erfolgreich beim Ovarialkarzinom eingesetzt werden könnten. In Kombination mit PARP-Inhibitoren zeigten sie einen synergistischen Effekt und könnten eine Verbesserung der Therapie erreichen (Konstantinopoulos et al., 2018). Ein weiterer therapeutischer Ansatz stellt die **intraperitoneale (i.p.) Chemotherapie** dar. In Studien konnte zwar durch die intraperitoneale Applikation von Cisplatin eine Verbesserung des Überlebens beobachtet werden, jedoch traten bei insgesamt hoher Toxizität vermehrt Komplikationen auf (Tsubulak et al., 2019). Im Vergleich dazu wurde Carboplatin i.p. besser toleriert. Dabei profitierten die Patienten mit einer BRCA-Mutation am meisten (Fujiwara et al., 2019). Angelehnt an die i.p. Chemotherapie wurde auch die **hyperthermische i.p. Chemotherapie (HIPEC)** in verschiedenen Studien evaluiert. Jedoch sind die Ergebnisse noch nicht abschließend zu beurteilen. Einige Studiengruppen berichten über keine Verbesserung des Überlebens durch HIPEC, wohingegen andere durchaus eine Berechtigung dieser Therapieform beschreiben (Riggs et al., 2020; Vergote et al., 2019). Daher kann aktuell der Einsatz der HIPEC beim Ovarialkarzinom in den Leitlinien noch nicht gerechtfertigt werden (Onkologie, 2019).

Die **Strahlentherapie** spielt aufgrund erhöhter Morbidität und Mortalität bei großem Strahlenfeld eine untergeordnete Rolle, obwohl das Ovarialkarzinom grundsätzlich strahlensensibel ist. Daher wird sie in ausgewählten Fällen vor allem lokalisiert bei Rezidiven eingesetzt (Onkologie, 2019).



Die **endokrine Therapie** stellt mit einer Ansprechrate von ca. 10% bei guter Lebensqualität eine Behandlungsmöglichkeit und Alternative zur Chemotherapie in der fortgeschrittenen Rezidivsituation dar. Das therapeutische Ansprechen basiert dabei weniger auf antihormoneller, sondern vielmehr auf antiangiogenetischer Wirkmechanismen.

Zur Behandlung des malignen Aszites ist der trifunktionale, bispezifische Antikörper **Catumaxomab** zugelassen, welcher sowohl die Anzahl der Tumorzellen im Aszites verringern als auch einen Anstieg der Immunzellen (B-/T-Helferzellen, NK-Zellen) bewirken kann. Des Weiteren konnte dadurch die Aszitesproduktion verringert werden (Wimberger et al., 2005). Catumaxomab ist in der Lage, die Symptome des Aszites zu verringern und sogar das Überleben positiv zu beeinflussen (Heiss et al., 2010). Dies ist ein Beispiel dafür, dass Immuntherapien ein vielversprechender therapeutischer Ansatz bei der Behandlung des Ovarialkarzinoms sein können.

Es gibt eine Reihe weiterer therapeutischer Ansätze, die nach derzeitiger Studienlage allerdings noch experimentell sind.

## 1.2 Immunologie beim Ovarialkarzinom

### 1.2.1 EGF-Rezeptor

Der epidermal growth factor receptor (**EGFR**) ist ein Wachstumsfaktorrezeptor, der zahlreiche Zellfunktionen vermittelt. Der Rezeptor besteht insgesamt aus drei Domänen. Eine extrazelluläre Domäne, an die die Liganden binden können, sowie eine transmembrane Domäne, die das Signal an die intrazelluläre Domäne weiterleitet, wodurch die Signalkaskade in Gang gesetzt wird. Durch Bindung von verschiedenen Liganden wird der Rezeptor dimerisiert. Zu den Liganden gehören unter anderem der transformierende Wachstumsfaktor- $\alpha$ , Amphiregulin, Heparin bindendes EGF und Betacellulin (Salomon et al., 1995). Der Rezeptor hat eine Tyrosinkinase-Aktivität, welche zur Vermittlung des intrazellulären Signals dient und durch die Dimerisierung aktiviert wird. Durch die Aktivierung werden verschiedene intrazelluläre Transkriptionsprozesse ausgelöst (Kessler, 2011), die wichtig für das Zellwachstum sind. Des Weiteren werden Überleben, Adhäsion und Zellmigration vermittelt (Jorissen et al., 2003). Die Funktion des EGF-Rezeptors kann in zweierlei Hinsicht beeinflusst werden. Zum einen kann durch Einsatz von monoklonalen Antikörpern (z.B. Cetuximab), die an die extrazelluläre Domäne binden, das Signal in das Zellinnere unterbrochen werden. Zum anderen können aber auch Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Erlotinib) über eine Verhinderung der Phosphorylierungsaktivität die Weiterleitung des Signals verhindern (Abb.4).

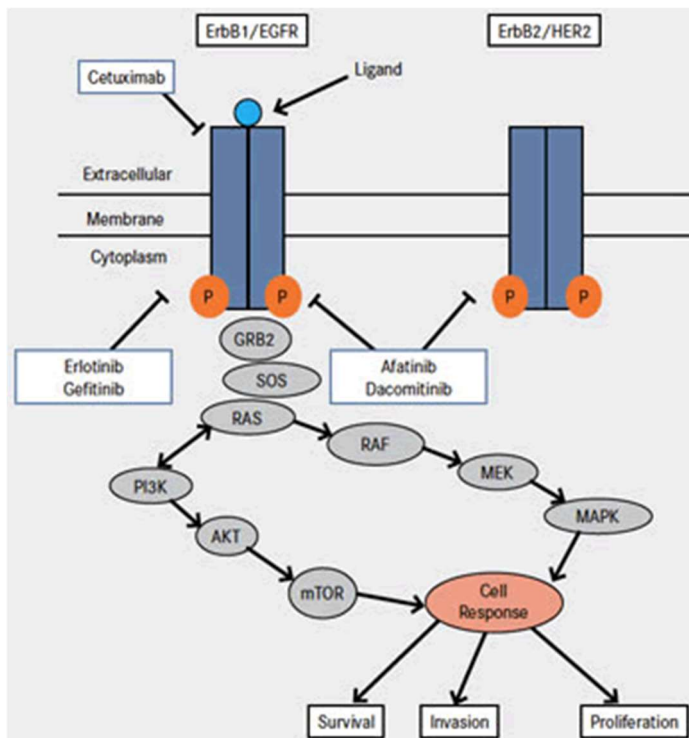


Abb. 4:

Dargestellt ist die Funktion des EGF-Rezeptors sowie die möglichen Angriffspunkte von EGFR-Therapeutika. An der extrazellulären Domäne wirken monoklonale Antikörper, wie Cetuximab, wodurch die Signalweiterleitung gehemmt und der Rezeptor zur Internalisierung gezwungen wird. Intrazellulär greifen die kleineren Moleküle der Gruppe der Tyrosinkinase-Inhibitoren an. Diese verhindern die Autophosphorylierung des Rezeptors und verhindern so die intrazelluläre Signalkaskade. Resultierend daraus wird das Überleben, die Proliferation sowie die Zellinvasion verhindert. (Denaro and Merlano, 2015)

Dieser Mechanismus ist vor allem in der Tumorthherapie von entscheidender Bedeutung (Herbst, 2004), da zahlreiche Malignome EGFR überexprimieren, was mit einer ungünstigen Prognose korreliert (Nicholson et al., 2001; Verbeek et al., 1998; Wang et al., 2016). Auch der überwiegende Teil der Ovarialkarzinome weist eine Überexpression des EGF-Rezeptors auf (Herbst and Langer, 2002), was ebenfalls mit einer ungünstigen Prognose und einem kürzeren, rezidivfreien Überleben assoziiert ist (Fischer-Colbrie et al., 1997) (Nicholson et al., 2001). Dies kann daher einen Ansatz für eine zielgerichtete Therapie darstellen (Moscatello et al., 1995).

### 1.2.2 Cetuximab

Der chimäre **monoklonale Antikörper Cetuximab** bindet spezifisch an den EGF-Rezeptor. Dieser Antikörper besteht aus leichten Ketten, die sich aus murinen Anteilen zusammensetzen sowie aus schweren Ketten, die aus humaner Herkunft stammen.

Durch Bindung von Cetuximab an den EGF-Rezeptor wird die Weiterleitung des EGFR-Signals verhindert und ebenfalls die Bindung des EGFR-Liganden blockiert (Abb.5). Zudem wird die Internalisierung des EGF-Rezeptors induziert, wodurch der intrazelluläre Abbau eingeleitet wird. Durch den Abbau kommt es im Verlauf zur Runterregulation des EGFR, wodurch die Zellen im Wachstum, in der Angiogenese sowie die Zellmigration und Invasion eingeschränkt werden (Bijman et al., 2009). Ebenfalls kann durch Einsatz von Cetuximab die Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) ausgelöst werden.

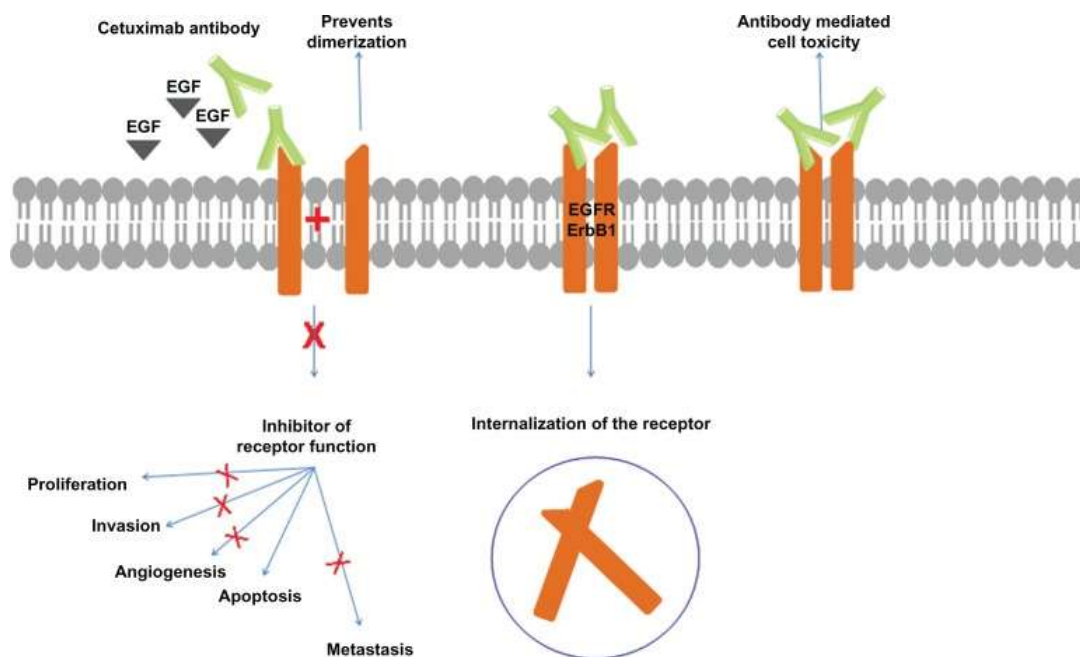


Abb. 5:

Dargestellt ist die Wirkungsweise des monoklonalen Antikörpers Cetuximab. Durch Bindung an den EGF-Rezeptor wird die Signalweiterleitung des Rezeptors blockiert, der Rezeptor zur Internalisierung markiert sowie die Antikörper vermittelte Zytotoxizität (ADCC) ausgelöst. Durch diese drei Reaktionen werden Tumorzellen in ihrer Ausbreitung eingeschränkt und ebenfalls für das Immunsystem zur Eliminierung sichtbar gemacht. (Patil et al., 2012)

Bei der klinischen Anwendung zeigt das Nebenwirkungsprofil von Cetuximab nur selten schwerwiegende Reaktionen. Jedoch zählt zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen eine akne-ähnliche Hautreaktion, welche die Patienten in ihrer Lebensqualität einschränkt. Zurzeit wird Cetuximab zur Behandlung des kolorektalen Karzinoms verwendet, welches ebenfalls eine Überexpression des EGFR zeigt. In Kombination mit einer Strahlen- oder Chemotherapie wird Cetuximab derzeit auch beim Plattenepithelkarzinom im Kopf- und Halsbereich eingesetzt (Baselga, 2001). In einem in-vivo Experiment konnte nachgewiesen werden, dass das Wachstum von Ovarialkarzinomzellen durch den Einsatz von Cetuximab inhibiert werden kann (Mendelsohn and Baselga, 2003). Allerdings verliefen klinische Studien, die Cetuximab als Monotherapie oder in Kombination mit Chemotherapie einsetzten, beim Ovarialkarzinom eher enttäuschend. Doch auch bei Vorliegen einer Resistenz gegenüber anti-EGFR-Therapeutika kann Cetuximab durch Rekrutierung und Aktivierung von Immunzellen (z.B. via ADCC) einen antitumoralen Effekt ausüben. Daher wurde Cetuximab in das immuntherapeutische Modell der vorliegenden Arbeit integriert.

### 1.2.3 Natürliche-Killerzellen (NK-Zellen)

**NK-Zellen** spielen vor allem bei der Elimination von Tumorzellen, sowie von virusinfizierten Zellen eine zentrale Rolle. Diese Zellen gehören zum angeborenen Immunsystem, wodurch eine schnelle und effektive Bekämpfung der Zielzellen möglich ist. Diese Reaktion des angeborenen Immunsystems ist der Antwort des adaptiven Immunsystems vorgeschaltet. Ebenfalls benötigen NK-Zellen keine spezielle antigenspezifische Aktivierung, um die Zielzellen abzutöten. NK-Zellen entstehen aus lymphatischen Vorläuferzellen, welche wiederum aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, den CLP-Zellen, abstammen. Ein wesentlicher Unterschied zu den anderen lymphatischen B- und T-Zellen besteht darin, dass NK-Zellen keine Antigenpezifität besitzen. Die Morphologie ähnelt zwar dem der Lymphozyten, jedoch zeigt sich eher ein granuläres Zytoplasma mit zytotoxischen Proteinen in den Granula (Perforin, Granzym). Diese zytotoxischen Proteine sind in der Lage, die Oberfläche der Zielzelle zu zerstören und in ihr eine Apoptose auszulösen. Des Weiteren besitzen NK-Zellen TRAIL-Proteine (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand), die mit DR4 und DR5 (death receptor 4 und 5) auf den Zielzellen interagieren und ebenfalls eine Apoptose einleiten.

NK-Zellen besitzen eine Vielzahl von Rezeptoren, welche für verschiedene Reaktionsabläufe verantwortlich sind. Zu unterscheiden sind aktivierende und inhibierende Rezeptoren, die die Signaltransduktion in die NK-Zelle beeinflussen. Dabei ist zu beachten, dass die Balance zwischen den Rezeptoren verantwortlich für eine Eliminierung der entsprechenden Zielzelle ist. Die **aktivierenden Rezeptoren** bestehen aus den Zytotoxizitätsrezeptoren, sowie NKG2D. NKG2D kann sowohl Heterodimere mit CD94 bilden, wobei diese an MHC-I HLA-E binden. Andererseits sind sie auch in der Lage, Homodimere zu bilden, welche an MHC-I-ähnliche Moleküle binden. Zu den MHC-I-ähnlichen Molekülen gehören unter anderem MIC-Moleküle (MIC-A und MIC-B), die vor allem durch Stress, sowohl zellulär als auch metabolisch, vermehrt exprimiert werden. Die Hochregulation der NKG2D-Liganden kann daher durch Bakterien, Viren oder auch bei Tumorzellen entstehen, wodurch die NK-Zellen in der Lage sind, diese Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Somit sind NK-Zellen fähig, nicht-körpereigene Zellen, dysregulierte Zellen (durch z.B. Virusinfektionen) und geschädigte Zellen (z.B. DNA-Schäden) zu erkennen und abzutöten. Zu den **inhibierenden Rezeptoren** gehören solche, die MHC-I-Moleküle auf den Zielzellen erkennen. In normalen Zellen werden MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche in großen Mengen exprimiert, wodurch die Zelle ihre Zugehörigkeit im Organismus symbolisiert. Wenn diese Oberflächenproteine fehlen, erkennt das Immunsystem diese Zelle als körperfremd an und versucht diese zu eliminieren. Dieses Phänomen wird als „missing-self-Hypothese“ beschrieben. Somit kann eine erhöhte MHC-I Expression auf der Zelloberfläche als Protektion gegenüber einer NK-Zell vermittelten Lyse angesehen werden.

Die NK-Zelle detektiert die Expression der MHC-I Moleküle über KIR- (killerzellenimmunglobulinähnliche Rezeptoren) und KLR-Rezeptoren (killerzellenlektinähnliche Rezeptoren). Durch verschiedene Polymorphismen der beiden Rezeptoren ist es möglich, verschiedene Arten von MHC-I Molekülen zu unterscheiden. Dadurch gelingt es der NK-Zelle auch Zellen zu erfassen, bei denen die MHC-I Struktur durch z.B. Viren verändert wurde. Ein weiterer wichtiger Rezeptor der NK-Zellen ist der Fc-Rezeptor. Dieser Rezeptor ist in der Lage verschiedene Antikörper an der konstanten Region zu binden und führt zur NK-Zell-Aktivierung. Daraus resultiert eine Ausschüttung der Granula aus der NK-Zelle und schließlich die Abtötung der mit den Antikörpern opsonierten Zielzelle (**ADCC, Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität**). (Murphy and Weaver, 2018).

NK-Zellen können nach Aktivierung ebenfalls selbst **Zytokine** (wie  $\text{IFN-}\gamma$ ) produzieren, die auf T-Effektorzellen wirken, um diese zu rekrutieren und bei der Aktivierung zu unterstützen. Die NK-Zellen selbst werden ebenfalls durch Interferone und Zytokine wie  $\text{IFN-}\alpha$ ,  $\text{IFN-}\beta$  und IL-12 aktiviert und in ihrer Effektivität verstärkt. Diese Substanzen werden vor allem von aktivierten Makrophagen freigesetzt, sodass bei Infektion oder Tumorerkrankungen eine enge Interaktion zwischen angeborener Immunität und nachgeschalteter adaptiver Immunantwort entsteht.

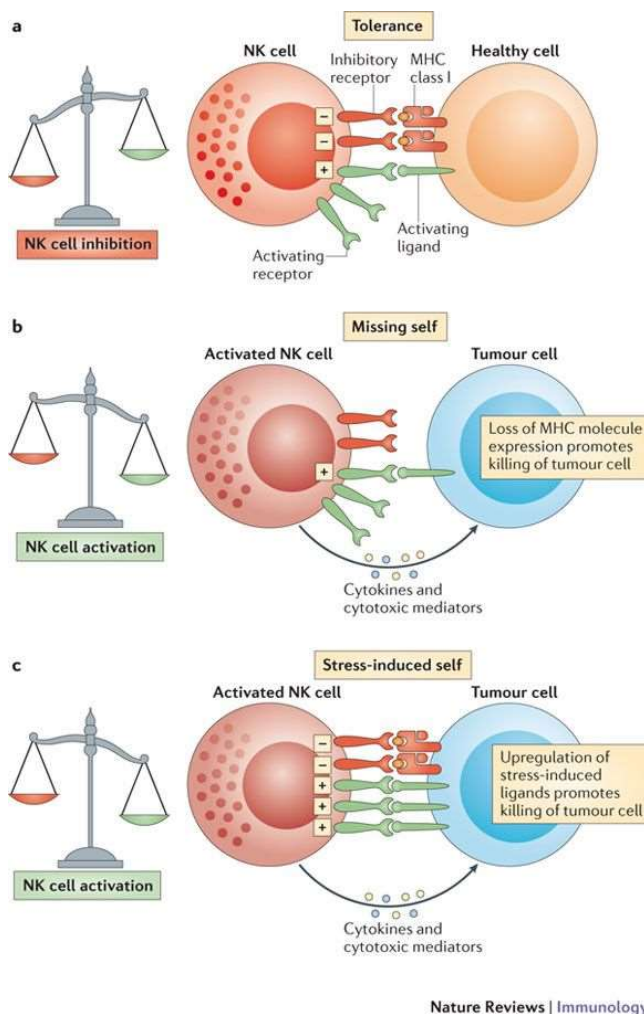


Abb. 6:

Dargestellt sind die Reaktionen von NK-Zellen auf verschiedene Rezeptorkonstellationen auf Zielzellen. Körper-eigene Zellen besitzen eine große Anzahl von MHC-I Molekülen auf der Oberfläche, die an die inhibierenden Rezeptoren der NK-Zelle binden. Ebenfalls weisen körpereigene Zellen Moleküle auf, die an aktivierende Rezeptoren binden, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß. Daher überwiegen die inhibierenden Signale in der NK-Zelle und die körpereigene Zelle wird nicht abgetötet. Weist hingegen z.B. eine Tumorzelle keine MHC-I Moleküle („missing-self“) auf, verbleiben nur die aktivierenden Moleküle auf der Zelloberfläche. Daher erkennt die NK-Zelle diese als nicht-eigen an und eliminiert die Tumorzelle. Wenn hingegen eine Zelle durch eine Virusinfektion oder Veränderung der Genexpression im Rahmen einer entarteten Zelle gestresst ist, werden bestimmte Rezeptoren hochreguliert. Diese Rezeptoren

binden an die aktivierenden Rezeptoren der NK-Zelle, wodurch ein Angriff der Zielzelle ermöglicht wird. (Vivier et al., 2012)

Aufgrund ihre vielfältigen antitumoralen Wirkungsweisen, ihrer unmittelbaren Aktivität ohne Notwendigkeit einer vorherigen Antigen-abhängigen Aktivierung und ihrer Fähigkeit zur ADCC wurden NK-Zellen als zelluläre Komponente im vorliegenden immuntherapeutischen Model dieser Arbeit gewählt. Ihr Verhalten, insbesondere ihre Interaktion zu Ovarialkarzinomzellen sowie verschiedene Möglichkeiten ihrer Beeinflussung sollen im Fokus der vorliegenden Arbeit stehen.

#### 1.2.4 Natürliche Zytotoxizität und ADCC

Die zwei wichtigen Mechanismen von NK-Zellen zur Abtötung von Zellen sind die natürliche Zytotoxizität und die Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). NK-Zellen sind in der Lage beide Mechanismen auszuüben.

Dabei beschreibt die **natürliche Zytotoxizität** ein in vitro und in vivo ablaufenden Mechanismus (s. Abb. 7). Die NK-Zellen detektieren über die vorher beschriebenen Rezeptoren (KIR, KLR etc.) die Molekülexpression auf den Zielzellen. Wenn die Zielzelle als nicht-eigen erkannt wird, tötet die NK-Zelle diese ab. Dies geschieht ohne vorherige Antigen-abhängige Aktivierung der NK-Zelle und läuft vor der Antwort der adaptiven Immunzellen ab (Pape et al., 1980). Hingegen beschreibt die **Antikörper-abhängige Zellzytotoxizität, ADCC**, einen Mechanismus, bei dem Antikörper als Mediator benötigt werden (s. Abb.7). Die Antikörper vom Typ IgG binden mit ihrer variablen Region an die Zielzelle, der konstante Fc-Teil wird an den Fc-Rezeptor Fc $\gamma$ RIII bzw. CD16 gebunden, der auf der Oberfläche von NK-Zellen lokalisiert ist (Román et al., 2013), (Murphy and Weaver, 2018). Durch diese Bindung wird die NK-Zelle aktiviert, was zur Sekretion der toxischen Granula führt. Dadurch wird die Zellmembran der Zielzelle zerstört und diese eliminiert.

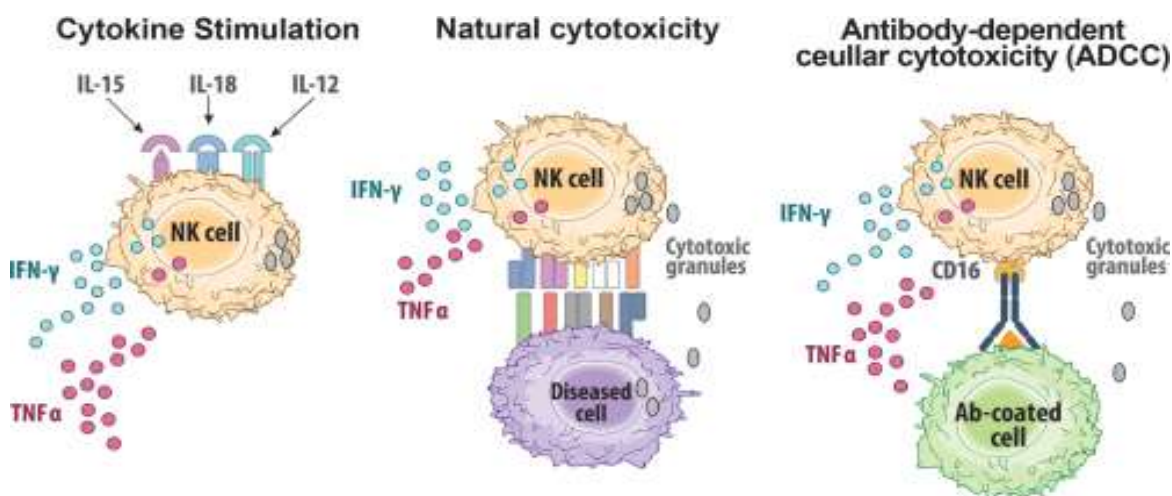


Abb. 7:

Diese Abbildung zeigt sekretorische und zytotoxische Wirkmechanismen von NK-Zellen. Nach Aktivierung sezernieren NK-Zellen Zytokine wie IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  (Bild links), wodurch andere Immunzellen (z.B. T-Zellen) rekrutiert werden können. Durch Interaktion von verschiedenen NK-Zell-Rezeptoren mit Rezeptoren auf der Zielzelle wird im Falle einer Fremderkennung die natürliche Zytotoxizität aktiviert (Bild Mitte). Die Antikörper-abhängige Zytotoxizität, ADCC (Bild rechts) wird nach Detektion des Fc-Teils eines Antikörpers, der die Zielzelle opsoniert, aktiviert. Sowohl die natürliche Zytotoxizität als auch die ADCC erfolgt über die Ausschüttung zytotoxischer Granula. Das in den Granula enthaltene Perforin und Granzym tötet die Zielzelle ab.

<https://www.sec.gov/Archives/edgar/data/1326110/000119312515254266/g917371g78g96.jpg>

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass Ovarialkarzinomzellen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber einer NK-Zellen-vermittelten natürlichen Zytotoxizität aufweisen. Dadurch ist die Immunantwort gegenüber Tumorzellen limitiert, wodurch eine verringerte Abtötung resultiert. Diese Resistenz kann jedoch durch den Einsatz monoklonaler Antikörper wie beispielsweise Cetuximab zumindest teilweise überwunden und somit eine Tumorzellelimination wiederhergestellt werden (Gottschalk et al., 2012).

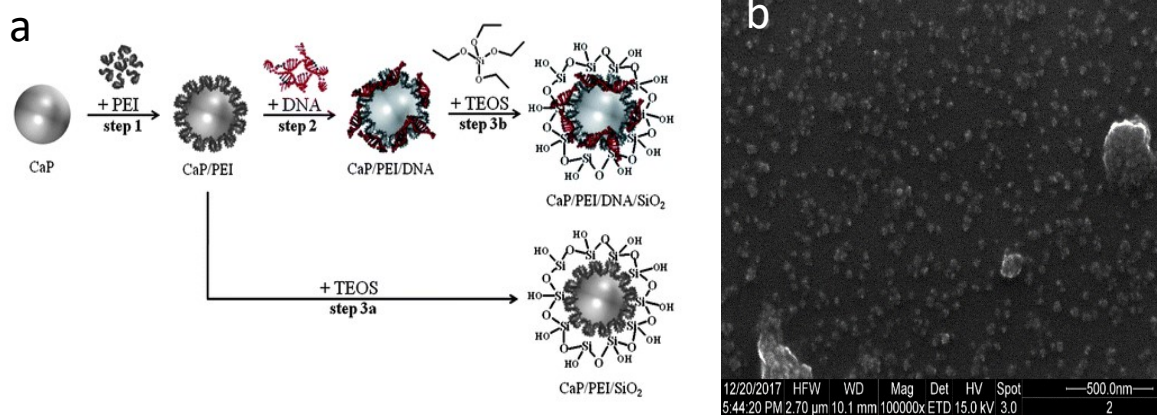
Cetuximab wurde in der vorliegenden Arbeit als ADCC-Vermittler verwendet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist, durch die Einbindung weiterer potenziell immunstimulierender Komponenten sowohl die NK-vermittelte natürliche Zytotoxizität als auch die ADCC zu verstärken.

### 1.3 Calciumphosphat-Nanopartikel

Der Einsatz von **Nanopartikeln (NP)** in der Medizin ist ein großes und noch nicht ausreichend erforschtes Gebiet. Ein wichtiges Feld stellt dabei die Diagnostik und Therapie maligner Tumore dar. Dabei können verschiedenste Nanotechnologien eingesetzt werden, um eine entsprechende Zielsetzung zu verfolgen. Nanopartikel können beispielsweise als Vektoren eingesetzt werden, um so eine Tumorzelle in ihrer Struktur zu verändern und sie besser für das Immunsystem sichtbar zu machen. Ebenfalls können Nanopartikel als Carrier fungieren und mit Wirkstoffen beladen werden, die toxisch für Tumorzellen sind. Auch für den Einsatz in der Diagnostik bieten Nanopartikel vielseitige Möglichkeiten. Darunter konnten beispielsweise eisenoxidhaltige Nanopartikel zur Detektion von Leberläsionen eingesetzt werden. Ebenfalls im experimentellen Bereich zum Staging von Rektumkarzinomen oder sogar zur Detektion einzelner Tumorzellen (Jordan, 2001). Ein weiterer möglicher Ansatz stellt die sogenannte zielgerichtete Therapie dar („targeted therapy“). Dabei werden die NP mit spezifischen Antikörpern oder Rezeptoren versehen, wodurch eine spezifische Bindung und Aufnahme in ausgewählte Zielzellen mit den entsprechenden Zielstrukturen erreicht wird. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer zielgerichteten Tumorthherapie mit verringerter

Toxizität für normale Körperzellen. Nanopartikel können zudem speziell als pH-sensitive oder temperatursensitive Transporter genutzt werden, wodurch die Therapie optimal an die Zielzelle angepasst werden kann (Nguyen, 2011). Es existiert eine Vielzahl verschiedener Nanopartikelpräparationen, am gebräuchlichsten sind kohlenstoffhaltige Nanopartikel oder Metallhaltige Nanopartikel. Bei Calciumphosphat-Nanopartikel bestehen die Nanopartikel aus Calciumphosphat, einem Stoff, welcher natürlicherweise im Körper vorkommt. Dabei ist Calciumphosphat für die Stabilität in Knochen und Zähnen von essenzieller Bedeutung. Ebenfalls ist Calcium ein wichtiger Bestandteil in der Membranphysiologie, sowie in der Weiterleitung von Nervenimpulsen. Phosphat ist im menschlichen Organismus eng mit Calcium verknüpft, da die Wechselwirkungen von  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{HPO}_4^{2-}$  - zum Hydroxylapatitkristall führen, welches in den Knochen eingelagert wird. Da das Löslichkeitsprodukt annähernd konstant bleibt, muss eine Erhöhung des Phosphats im Plasma mit einer Reduzierung des Calciums einhergehen (Klinke et al., 2010). Durch das natürliche Vorkommen im menschlichen Organismus bieten Calciumphosphat-NP eine Möglichkeit der Therapie mit geringem Toxizitätsrisiko, sowie einer guten Biokompatibilität für den Körper. Ein weiterer Vorteil in der Verwendung von Calciumphosphat-NP ist die leichte und schnelle sowie kostengünstige Herstellung.

Der Grundstruktur der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Calciumphosphat-NP ist dreischalig (s. Abb. 8a).



**Abb. 8:**

- a) Dargestellt ist der schematische Aufbau von Calciumphosphat-NP. Zuerst wird ein Kern aus Calcium und Phosphat hergestellt. Dieser wird zur Stabilisierung mit Polyethylenimin (PEI) überzogen. Anschließend kann DNA, RNA oder auch Fluoreszenzpartikel wie FITC daran gekoppelt werden. Zum Schluss wird der NP mit einer Silicahülle bedeckt, an die bei Bedarf weitere Stoffe, z.B. Antikörper, gebunden werden können. (Kozlova et al., 2012).
- b) Calciumphosphat- NP nach ihrer Herstellung als elektronenmikroskopisches Bild. Angegeben ist der Maßstab von 500nm. Es lassen sich neben den einzeln liegenden Nanopartikeln noch zwei größere Konglomerate erkennen. Jedoch ist der überwiegende Teil gut separiert. Dargestellt sind Calciumphosphat-



NP, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC und dem Antikörper Cetuximab gekoppelt sind (CaP-PEI<sub>FITC</sub>-SiO<sub>2</sub>-Cet).

Fotografiert und analysiert von Sebastian Kollenda, Institut für anorganische Chemie, Uni Duisburg-Essen.

Zuerst wird durch die Mischung von Calciumnitrat und Diammoniumhydrogenphosphat ein Calciumphosphat-Kern hergestellt, wobei beide Lösungen denselben pH-Wert besitzen sollten. Anschließend wird Polyethylenimin hinzugegeben, um den Kern zu stabilisieren. Gegebenenfalls kann dieser stabilisierte Kern zusätzlich mit DNA, RNA oder mit Fluoreszenzsubstanzen (z.B. FITC) versehen werden (Sokolova et al., 2006). Die NP werden zum Schluss mit einer Silicahülle umschlossen, die die Möglichkeit bietet, Substanzen kovalent zu binden. Die freien SH-Gruppen der Silicahülle können daher verwendet werden, um Antikörper wie das vorher beschriebene Cetuximab daran zu binden. So entsteht ein funktionalisierter NP, der als Ansatz für eine zielgerichtete Therapie eingesetzt werden kann (Kozlova et al., 2012). Die NP für die vorliegende Arbeit wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. M. Epple am Institut für anorganische Chemie der Universität Duisburg-Essen hergestellt und entsprechend der Fragestellung individualisiert (FITC, siRNA etc.).

Durch die geringe Größe der NP, die je nach Beladung zwischen 50-80nm variiert, können sie leicht von Zellen aufgenommen werden (Sokolova and Epple, 2008). Die Aufnahme erfolgt über Endozytose, wodurch die NP im Zytoplasma zunächst im Endosom vorliegen (s. Abb. 9). Anschließend erfolgt die Verschmelzung vom Endosom und Lysosom zum Endolysosom. Durch diese Verschmelzung sinkt der pH-Wert im Endolysosom und führt zum Zerfall der NP. Dadurch entsteht innerhalb des Endolysosoms ein osmotischer Druck, was einen Wassereinstrom bewirkt und letztendlich zur Ruptur des Endolysosoms führt. Nun liegt die DNA oder RNA frei im Zytoplasma und kann entweder dort ihre Funktion ausüben (als RNA) oder in den Zellkern wandern um dort die Wirkung zu entfalten (als DNA) (Neuhaus et al., 2016).

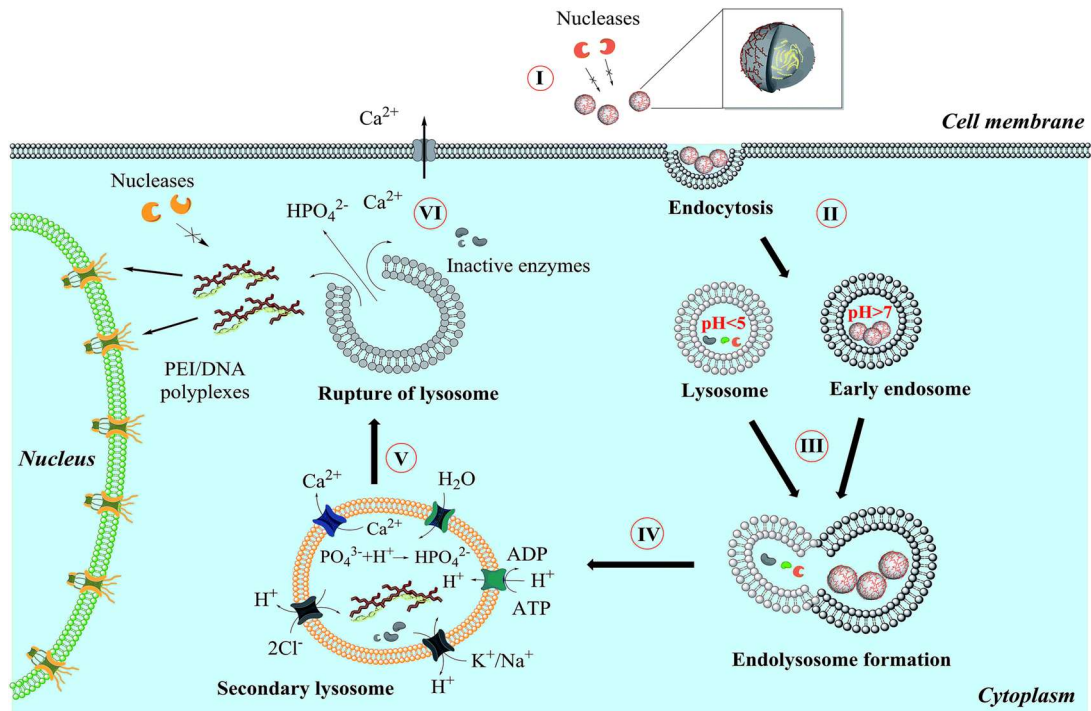


Abb. 9:

Gezeigt wird eine schematische Darstellung von der Aufnahme der NP in eine Zelle. Zuerst erfolgt die Endozytose mit anschließender Verschmelzung des Lysosoms zum Endolysosom. Dadurch zerfallen die NP in ihre Bestandteile mit der Folge der Ruptur des Endolysosoms. Somit liegt die DNA frei im Zytoplasma und kann dann in den Zellkern wandern und ihre Funktion ausüben. (Neuhaus et al., 2016)

Aufgrund der zahlreichen Verwendungsmöglichkeiten und der geringen Toxizität wurden Calciumphosphat-NP im vorliegenden Projekt ausgewählt und stellen eine zentrale Komponente in dieser Arbeit dar. Um ein optimiertes zielgerichtetes Therapeutikum herzustellen, wurden die NP in verschiedenen Zusammensetzungen mit RNA, dem Fluoreszenzmarker FITC sowie dem Antikörper Cetuximab kombiniert. Im Folgenden soll die Interaktion der Nanopartikel mit Ovarialkarzinomzellen sowie die Beeinflussung von NK-Zellen erörtert werden. Ebenfalls wird die daraus resultierende antitumorale Wirkung sowie ihr Potential als mögliches Immuntherapeutikum beim Ovarialkarzinom untersucht.

#### 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ovarialkarzinom steht an fünfter Stelle der häufigsten Tumore bei der Frau und stellt, durch die oftmals späte Diagnose sowie einer schlechte Prognose (5-JÜR von ca. 43%), eine große Herausforderung dar. Eine vollständige chirurgische Resektion mit anschließender systemischer, platinhaltiger Chemotherapie ist die aktuelle Standardtherapie (Onkologie, 2019).

Trotz multimodaler Ansätze ist die Effektivität dieser Therapiemöglichkeiten begrenzt. Dies zeigt sich in der hohen Rezidivrate (80%), hervorgerufen durch zunehmende Chemotherapieresistenz aber

auch durch verschiedenen Immun-Escape-Mechanismen. Ein Beispiel dafür ist die natürliche Resistenz von Ovarialkarzinomzellen gegenüber antitumorale NK-Zell-Aktivität (Gottschalk et al., 2012).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Erarbeitung eines immuntherapeutischen Modells zur Überwindung dieser Resistenz und Steigerung der NK-Zell-Aktivität. Ein wichtiger Angriffspunkt stellt der EGF-Rezeptor dar, welcher für das Wachstum und das Überleben der Zelle verantwortlich und bei vielen Ovarialkarzinomen überexprimiert ist (Herbst and Langer, 2002). Der Einsatz des EGFR-spezifischen Antikörpers Cetuximab führt, neben einer Wachstumshemmung der Zielzelle, über eine Bindung an NK-Zellen zu deren Aktivierung. Dieser Mechanismus wird als Antikörpervermittelte zelluläre Zytotoxizität (ADCC) beschrieben und endet mit der Eliminierung der Zielzelle. Über den ADCC-Mechanismus kann somit ein Teil der natürlichen Resistenz der Ovarialkarzinomzellen gegenüber NK-Zellen überwunden werden. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, durch Modulation verschiedener Rezeptoren, wie MHC-I und MIC A, die ADCC zusätzlich zu modulieren und so die Tumorzelleliminierung zu unterstützen.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit der Stellenwert sog. Calciumphosphat-Nanopartikel evaluiert. Ziel war es, über den Einsatz dieser Partikel die Sensitivität der Tumorzellen gegenüber der NK-Zell-Zytotoxizität zu steigern und/oder die antitumorale Aktivität von NK-Zellen zu potenzieren. Calciumphosphat-Nanopartikel besitzen den Vorteil, dass sie eine geringe Toxizität für den menschlichen Organismus aufweisen und funktionalisiert werden können, was in der vorliegenden Arbeit in Form einer Bindung an Cetuximab und des Einsatzes spezifischer siRNA umgesetzt wurde.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss Aszites auf das immuntherapeutische Modell hat. Durch die Ausbreitung per continuitatem und daraus resultierender Peritonealkarzinose mit begleitendem malignem Aszites wird ein spezielles proinflammatorisches und immunsuppressives Tumormikromilieu erzeugt. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit zellfreie Aszitesproben von mehreren Patienten im Rahmen der Erstdiagnose und -OP asserviert, um eine mögliche Beeinflussung von Aszites auf die Interaktion zwischen Tumor- und NK-Zellen zu untersuchen. Außerdem wurden die Aszitesproben hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften charakterisiert.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Methoden

#### 2.1.1 Tumorzellkultivierung

Die Zelllinien IGROV-1 und SKOV-3 wurden freundlicherweise aus der Universitätsfrauenklinik Bonn zur Verfügung gestellt. Die Linien OVCAR-3, OVCAR-4 und JAI stammen aus der Tumorforschung der Inneren Medizin des Universitätsklinikum Essen. Die Zelllinien werden in Rxx10 (Universalmedium) und Plastikkulturflaschen bei 37°C mit 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Rxx10 wird aus RPMI 1640 hergestellt, indem 10 % FCS und zum Schutz vor bakteriellen Infektionen 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) zugegeben wurden. Zur Passagierung wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung) gewaschen. Nach dem Absaugen werden die Zellen mittels StemPro Accutase abgelöst, indem sie für 3-5 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert werden. Nach anschließender Zentrifugation der Tumorzellsuspension bei 300 g und 4 °C für 7 min, kann der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 1ml Rxx10 resuspendiert werden. Die Zellzahl wird in einem CasyCounter bestimmt. Die Zellen können danach im Rxx10-Medium auf eine gewünschte Konzentration eingestellt werden.

#### 2.1.2 NK-Zell-Isolation

Isoliert werden die NK-Zellen aus Buffy Coats, welche als Nebenprodukt bei der Vollblutspende entstehen und freundlicherweise von der Transfusionsmedizin des Universitätsklinikum Essen bereitgestellt wurden.

Die Auftrennung der Zellen aus Buffy Coats erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation (Ficoll-Hyaque-Separation). Dazu wird in 50 ml Falcontubes 15 ml Bicolll Lösung vorgelegt. Ebenso werden 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit DPBS zur Verdünnung vorbereitet (in der Regel Verdünnung 1:8). Es werden ca. 33 ml des verdünnten Blutgemisches vorsichtig auf die vorgelegte Bicolll Lösung geschichtet. Dann werden die Tubes bei Raumtemperatur (RT), bei 300 g mit langsamem Anlauf und ohne Bremse für 30 min zentrifugiert. Die mononuklearen Zellen des peripheren Blutes (PBMC) befinden sich entsprechend ihrer Dichte in der Interphase und werden mit einer Einwegpipette in ein neues Falcontube überführt. Dieses Falcontube wird mit DPBS auf 50 ml aufgefüllt und bei 4 °C bzw. RT für 10 min bei 460 g zentrifugiert. Nach Ende der Zentrifugation wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Dieser Waschvorgang wird min. drei Mal wiederholt. Das Zellpellet wird danach in 1 ml Rxx10 resuspendiert und mit 19 ml Rxx10 aufgefüllt. Die Zellzahl wird mittels CasyCounter bestimmt. Zur Abtrennung der Monozyten wird die Zellflüssigkeit in eine 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt und für 1 h bei 37 °C

mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert (Plastikadhärenz). Die verbleibenden nicht-adhärenenten Lymphozyten werden anschließend in ein neues 50 ml Falcontube überführt und bei 460 g für 10 min bei 4 °C/RT zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wird in 1 ml DPBS resuspendiert, mit DPBS auf 10 ml aufgefüllt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen werden dann bei 460 g für 10 min bei 4 °C/RT zentrifugiert. Währenddessen wird der MACS-Puffer bei 2000 g für 10 min entgast. Danach sollte dieser auf Eis gelagert werden. Aus der bestimmten Zellzahl werden die Mengen der benötigten Reagenzien für das NK-Isolations Kit von Miltenyi ermittelt. Dazu wird das im Folgenden beschriebene Schema (Tab. 2) verwendet:

<u>Zellzahl *10<sup>7</sup></u>	<u>MACS-Puffer I</u>	<u>NK-Cocktail I</u>	<u>MACS-Puffer II</u>	<u>NK-Cocktail II</u>	<u>Auf 1ml Endvolumen</u>
x	x*40	x*10	x*30	x*20	+Menge an Puffer bis 1000 µl

Tab. 2

Nach der Zentrifugation wird der Überstand komplett abgenommen. Die NK-Zellen werden nach dem entsprechenden Protokoll (NK Cell Isolation Kit human, MACS Miltenyi Biotec) isoliert. Das Wirkungsprinzip dieser NK-Zell Isolation beruht auf Antikörpern, welche an Magnetpartikel (Microbeads) gekoppelt sind. Diese Antikörper sind gegen spezifische Oberflächenrezeptoren sämtlicher Immunzellen mit Ausnahme von NK-Zellen gerichtet. Die Suspension wird über die magnetischen MACS-Säulen gegeben und lässt lediglich die unmarkierten NK-Zellen passieren (negative Selektion). Die komplette Flüssigkeit wird im Tube aufgefangen und zentrifugiert (460 g, 4 °C/RT, 10 min). Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Rxx10 resuspendiert. Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, wird eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellen können entweder direkt weiterverarbeitet oder über Nacht inkubiert werden. Bei der Inkubation über Nacht werden die NK-Zellen in eine 24-er well-Platte pipettiert (1-2 ml pro Well) und mit 5 U/ml IL-15 behandelt. Bei Verwendung stimulierter NK Zellen werden diese mit 100 U/ml IL-15 und 10 ng/ml IL-18 je  $1 \cdot 10^6$  NK-Zellen/ml über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag können diese weiterverarbeitet werden.

### 2.1.3 Durchflusszytometrie

Um die NK-Zell-Degranulation sowie verschiedene Rezeptorexpressionen quantifizieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Durchflusszytometrie angewandt. Prinzipiell kommen dabei Laserstrahlen zum Einsatz, die von der Zelle reflektiert und gestreut werden. Diese werden von verschiedenen Detektoren erfasst, wodurch Zellgröße (forward scatter, FSC) und Zellgranularität (sideward scatter, SSC) definiert werden. Zur Detektion bestimmter Zielstrukturen werden spezifische Antikörper eingesetzt. Diese sind entweder direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff

konjugiert oder werden mit sekundären Antikörpern, welche an die Fluorochrome gekoppelt sind, detektiert. Diese Fluorochrome werden von Lasern entsprechender Wellenlänge angeregt. Das entsprechend emittierte Licht wird durch ein komplexes Spiegel- und Filtersystem geleitet und anschließend von wellenlängenspezifischen Detektoren erfasst und in eine Signalstärke umgewandelt, was eine Quantifizierung ermöglicht. Bei jeder spezifischen Färbung wird eine Isotyp-Kontrolle mitgeführt, die Autofluoreszenz von Zelle und unspezifischer Antikörperbindung repräsentiert. Der jeweilige Isotyp muss daher der gleichen Antikörperklasse wie der spezifische Antikörper angehören und mit demselben Fluorochrom gekoppelt sein. Die eigentliche Expressionsstärke ergibt sich somit aus der Differenz der Expressionsstärke des spezifischen Antikörpers und der des Isotypen. Die Analysen in der vorliegenden Arbeit wurden am 3-Laser-Durchflusszytometer FACS Canto II und der BD FACSDiva™ Software durchgeführt. Je nach Fragestellung und Assay werden die Ergebnisse in Dot-Plots oder Histogrammen dargestellt.

#### 2.1.4 CD107a-Degranulationsassay

Die isolierten NK-Zellen werden in ein Eppendorf-Gefäß oder ein Falcontube überführt und bei 460 g bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen in Medium resuspendiert. Dann wird die Zellzahl bestimmt und die Zellen auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. In der Zwischenzeit werden die Tumorzellen (TZ) abgesaugt, gewaschen und mittels Accutase abgelöst. Die Tumorzellflüssigkeit wird abpipettiert und in ein Falconröhrchen überführt, welches bei 300 g, 4 °C/RT für 7 min zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Die Zellzahl wird in einem CasyCounter bestimmen und auf  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Somit werden Tumorzellen und NK-Zellen im Verhältnis 1:1 inkubiert. Die 96-er Well Platte wird nach folgenden Schema (Tab. 3) pipettiert:

	<b>NK-Kontrolle</b>	<b>NK+TZ</b>	<b>NK+TZ+Cet</b>
<b>CD107a-FITC</b>	5 µl	5 µl	5 µl
<b>NK</b>	25 µl	25 µl	25 µl
<b>TZ</b>	/	25 µl	25 µl
<b>Cet (2 µg/ml)</b>	/	/	50 µl
<b>Rxx10</b>	75 µl	50 µl	/

Tab. 3

In Versuchsansätzen mit Aszites wird folgendes Pipettierschema (Tab. 4) angewandt:

NK-Zellen, die mit Aszites inkubiert werden, sollten in Rxx20 (20 % FCS, 1 % P/S) kultiviert sein.

	NK-Kontrolle	NK+TZ	NK+TZ+Cet.	NK+TZ+Asz.	NK+TZ+Asz.+Cet
<b>CD107a-FITC</b>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<b>NK</b>	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl (Rxx20)	50 µl (Rxx20)
<b>TZ</b>	/	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b>Asz.</b>	/	/	/	15 µl	15 µl
<b>Rxx10</b>	150 µl	100 µl	75 µl	85 µl	60 µl
<b>2h Inkubieren (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>)</b>					
<b>Cet (8 µg/ml)</b>	/	/	25 µl	/	25 µl

Tab. 4

Die Verwendung von Aszites mit vorinkubierten NP wird wie folgt durchgeführt: Die entsprechende Menge an Aszitesflüssigkeit wird in ein separates Eppendorfgefäß überführt und im Verhältnis 2:1 mit NP (gelöst in sterilem Wasser) gemischt. Dann folgt eine 30-minütige Inkubationszeit bei RT. Anschließend wird die Probe bei 11000 g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert und nur der Überstand wird für den Versuch verwendet. Es wird dasselbe Schema wie aus Tab. 4 verwendet.

Im Versuchsansatz mit CaP-NP wird nachfolgendes Schema eingesetzt (Tab. 5):

	NK	NK+TZ	NK+TZ+Cet	NK+TZ+NP	NK+TZ+NP+Cet
<b>CD107a-FITC</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<b>NK</b>	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
<b>TZ</b>	/	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
<b>Cet (4 µg/ml)</b>	/	/	25 µl	/	25 µl
<b>NP</b>	/	/	/	12,5 µl	12,5 µl
<b>Rxx10</b>	75 µl	50 µl	25 µl	37,5 µl	12,5 µl

Tab. 5

Um den Einfluss von aus dem Aszites eluierten IgG-Antikörpern auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zu untersuchen, wurde folgender Versuchsansatz mit nachfolgendem CD107a-Degranulationsassay gewählt (Tab. 6):

	NK	NK+TZ	NK+TZ+Cet	NK+TZ+IgG-AK	NK+TZ+IgG-AK+Cet
<b>CD107a- FITC</b>	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
<b>NK</b>	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
<b>TZ</b>	/	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
<b>IgG-AK</b>	/	/	/	5 µl	5 µl
<b>PBS</b>	5 µl	5 µl	5 µl	/	/
<b>Rxx10</b>	70 µl	45 µl	32,5 µl	45 µl	32,5 µl
<b>1h inkubieren</b>					
<b>Cet (8 µg/ml)</b>	/	/	12,5 µl	/	12,5 µl

Tab. 6

Grundsätzlich wird die Platte in den einzelnen Versuchsansätzen für 1 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wird entsprechend des jeweiligen Versuchsansatzes 1 µl (Tab. 3, 5, 6) bzw. 2 µl (bei Tab. 4) Monensin von einer 1:6 Vorverdünnung hinzugegeben (50 µl Medium + 10 µl

Monensin). Die Platte wird dann für 5 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend bei 460 g, 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen.

Nun wird die Färbung für die NK-Zellen vorbereitet. Dafür wird der spezifische Antikörper CD56bv421 bzw. dessen Isotyp im Verhältnis 1:50 mit PBS+3 % HS verdünnt, wovon 50 µl pro Well pipettiert werden. Die Platte wird dann für 30 min im Kühlschrank (4 °C, dunkel) inkubiert. Danach wird pro Well 150 µl PBS+3 % FCS zugegeben um die Platte bei 460 g, 4 °C für 5 min zu waschen. Der Überstand wird wieder verworfen. Nun werden pro Well 200 µl PBS+3 % FCS pipettiert, resuspendiert, in FACS-Tubes überführt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.1.5 Bestimmung der MHC-I-, EGFR- und MICA-Expression

Die Expression von MHC, EGFR und MICA wird durchflusszytometrisch bestimmt. Dazu werden die TZ in einer 96er U-bottom bzw. f-bottom (bei Transfektion) Platte pipettiert und bei 460 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Bei schon kultivierten TZ werden diese gewaschen, mittels Accutase abgelöst und zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Anschließend werden die Antikörper für die Zellfärbung in PBS+3 % HS vorgelegt. Für die MHC-I-Rezeptorfärbung wird MHC-I-PE (1:200) und der Isotyp IgG2a-PE (1:50) benötigt. Um EGFR zu färben, wird EGFR-PE (1:10) und der Isotyp IgG2b-PE (1:10) verwendet. Für die MICA-Färbung wird MICA-PE (1:5) und der Isotyp IgG2b-PE (1:200) vorgelegt. Von den Antikörpern werden jeweils 50 µl pro Well pipettiert und die Platte für 30 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird pro Well 200 µl PBS + 3 % FCS hinzugegeben, um diese bei 460 g bei 4 °C für 5 min zu waschen. Danach wird der Überstand verworfen, die Zellen in 200 µl/Well PBS+3 % FCS resuspendiert und in FACS Tubes überführt. Anschließend werden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

### 2.1.6 Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der Aufnahme von Nanopartikeln durch Tumorzellen wird zunächst eine 24er-well-Platte mit Deckgläschen vorbereitet. Dann werden diese einmal mit Ethanol, anschließend mit Terralin gewaschen und zum Schluss mit PBS gespült. Nun können 5 Wells (Kontrolle und je zwei Wells für eine NP-Charge) mit je 50.000 TZ vorbereitet und mit Rxx10 auf 500 µl aufgefüllt werden. Die Zellen sollten mindestens drei Tage inkubieren. Dann können die Zellen mit NP behandelt werden, indem die NP in sterilem Wasser aufgelöst werden (NP+FITC; NP+Cet+FITC). In diesem Versuch wurden 50 µl der NP-Suspension pro Well pipettiert und mit Rxx10 auf 500 µl aufgefüllt. Somit entstand bei den NP+Cet+FITC eine Cetuximab Konzentration von 1 µg/ml. Die Zellen werden für min. drei Stunden bis max. sechs Stunden inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die



Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) (500 µl/Well) für 10-15 min bei RT fixiert und dann mit PBS gewaschen. Nun werden die Zellen mit Dapi für 20 min. bei RT inkubiert und somit gefärbt. Dabei färbt DAPI die DNA an, indem es sich in diese einlagert. Durch Anregung mittels ultravioletten Lichts kann DAPI unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dann werden die Zellen mit PBS gewaschen. Zum Schluss werden die Deckgläschen aus den Wells entnommen, um diese mit Fluoreszenzeindeckmittel auf Objektträgern zu fixieren. Mikroskopiert wurde mit dem Axioskop 2 von Zeiss in der 40er-Vergrößerung und mit der Software AxioVision 4.9.14 analysiert. Die Zellen wurden visuell ausgezählt und der prozentuale Anteil der Zellen mit FITC-Signal in Bezug auf die Zellen mit Dapi Signal angegeben.

### 2.1.7 Nanopartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Calciumphosphat-Nanopartikel wurden freundlicherweise von Sebastian Kollenda, Mitarbeiter der anorganischen Chemie der Universität Duisburg Essen, hergestellt.

Die Nanopartikel bestehen aus einem Calciumphosphat-Kern, welcher mit PEI beschichtet wird. Dann kann gegebenenfalls DNA, RNA oder Fluoreszenzfarbstoff (z.B. FITC) an den Nanopartikel gekoppelt werden. Anschließend wird das Ganze mit einer Silicahülle versehen, an die Antikörper (z.B. Cetuximab) gebunden werden können.

Durch die Möglichkeit, Calciumphosphat-Nanopartikel unterschiedlich zu funktionalisieren, wurde diese in der vorliegenden Arbeit in verschiedenen Versuchen eingesetzt. Durch Funktionalisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (CaP-PEI-SiO-S-FITC) kann die Aufnahme von den Nanopartikeln in die Zielzellen verfolgt werden. Die Nanopartikel, welche mit RNA (CaP-PEI-RNA-SiO-SH) beladen wurden, kamen in der Transfektion von Tumorzellen zum Einsatz. Nanopartikel, welche mit Cetuximab (CaP-PEI-SiO-S-Cet) funktionalisiert wurden, konnten für die NK-Zellaktivierung in den CD107a-Degranulationsassay eingesetzt werden. Die Eigenschaft der Calciumphosphatnanopartikel, Proteine auf der Oberfläche zu binden („Protein-Corona“), wurde sich in Experimenten mit Aszites zunutze gemacht.

Alle Calciumphosphat-Nanopartikel werden zur Aufbewahrung lyophilisiert und in Aliquoten unterteilt. Dadurch sind die NP bei Lagerung im Gefrierfach (-20 °C) praktisch unbegrenzt haltbar. Um diese dann zu benutzen, löst man die Nanopartikel in sterilem Wasser auf (stabil für 2 Wochen). Diese können dann je nach Assay weiterverarbeitet werden.

Für weitere methodische Details zur Herstellung der CaP-NP wird auf folgende Publikationen verwiesen:

(Sokolova and Epple, 2011) (Kozlova et al., 2012) (Neuhaus et al., 2016) (Kollenda, 2020)

### 2.1.8 Transfektion

Durch Transfektion sollen in der vorliegenden Arbeit die Rezeptorexpressionen von MHC-I und MICA in Tumorzellen moduliert werden. Dazu wird mithilfe verschiedener Transfektionsreagenzien wie Lipofectamin und Calciumphosphat-NP silencing mRNA (siRNA) bzw. DNA in die Zelle geschleust. Die Modulation dieser Rezeptoren soll die Suszeptibilität der Tumorzellen gegenüber zytotoxischer NK-Zell-Aktivität erhöhen.

Die Protokolle erstrecken sich über 4 Tage.

**Tag 1.** Die TZ werden nach Protokoll vorbereitet und auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  oder  $0,5 \cdot 10^6$  (MICA-Transfektion) gebracht. Die TZ werden in eine 12er well-Platte mit 200.000 Zellen/Well bzw. für die MICA-Transfektion 25.000 TZ in eine 96er f-bottom Platte eingesetzt, mit Medium aufgefüllt und inkubiert ( $37^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$ ). Es wird 1 Well als Kontrolle, 1 Well für non-sense-RNA und 1 Well für siRNA vorbereiten.

**Tag 2.** An diesem Tag werden die Zellen transfiziert. Es kann Lipofectamin 2000 oder funktionalisierte NP verwendet werden.

Bei Verwendung von Lipofectamin, wird pro Well 1  $\mu\text{l}$  (vorheriger Versuch 0,5  $\mu\text{l}$ ) bzw. für die f-bottom Platte 2  $\mu\text{l}$  (MICA-Transfektion) in 50  $\mu\text{l}$  RPMI+P/S pipettiert. Ebenso wird ein 2. bzw. 3. Eppendorf Gefäß vorbereitet, in welches pro Well 50  $\mu\text{l}$  RPMI+P/S und 1  $\mu\text{l}$  von der non-sense-RNA (Kontrolle) bzw. der spezifischen siRNA pipettiert wird. Für die MICA-Transfektion werden 2  $\mu\text{l}$  der MICA DNA in 50  $\mu\text{l}$  RPMI+P/S gegeben. Das Lipofectamin wird 1:1 mit der verdünnten RNA bzw. DNA gemischt. Diese Mischung wird dann für 10-15 min bei RT inkubiert. Pro Well werden davon 100  $\mu\text{l}$  bzw. 10  $\mu\text{l}$  (MICA-Transfektion) auf die Zellen pipettiert und mit Rxx10 auf 1 ml bzw. 100  $\mu\text{l}$  (MICA-Transfektion) aufgefüllt.

Wenn man gefrieretrocknete NP als Transfektionsreagenz verwendet, werden diese in sterilem Wasser aufgelöst. Je 100  $\mu\text{l}$  aliquote wird ein Well mit zuvor 200.000 eingesetzten Zellen benötigt. Das Well wird anschließend mit 900  $\mu\text{l}$  Medium aufgefüllt.

Die Zellen werden bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  für 6 h inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt und die Zellen werden mit 1 ml DPBS pro Well gewaschen. Neues Medium wird aufgefüllt und die Zellen werden 2 Tage inkubiert.

**Tag 3.** NK-Zellisolation nach Protokoll (s. Kapitel 2.2.2) bzw. Tag 3-5 MICA-Expressionsmessung (s. Kap 2.2.5)

**Tag 4.** Am letzten Tag wird ein Degranulations-Assay durchgeführt. Dazu müssen zuerst die TZ mittels Accutase abgelöst werden. Anschließend werden die TZ resuspendiert, in Eppendorfgefäße überführt und bei  $4^\circ\text{C}$  für 7 min bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Die TZ werden dann im CasyCounter gezählt und auf eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt.

Ebenso müssen die NK-Zellen resuspendiert, zentrifugiert (460 g, 10 min, 4 °C) und gezählt werden. Die Konzentration wird ebenfalls auf  $1 \cdot 10^6$ /ml eingestellt. Abschließend werden die Zellen nach zuvor beschriebenem Schema in den Degranulations-Assay eingesetzt.

#### 2.1.9 Modulation der MICA Expression durch adenovirale Transduktion

Adenovirale Transduktionen basieren auf einem nicht-Zellzyklus gebundenen Gentransfer mittels viralen Vektor in Zellen. Da es sich um Adenoviren handelt, können menschliche Zellen leicht infiziert werden und das transduzierte Gen wird zudem nicht in die DNA der Zielzelle integriert. Das Ziel ist eine hohe, temporäre Expression des entsprechenden Gens, in diesem Fall des MICA-Rezeptors. Durch die starke Expression des MICA-Rezeptors soll die Tumorzelle besser von den NK-Zellen detektiert und eliminiert werden. Da in diesem Versuch mit einem potenziell infektiösen Virus gearbeitet wird, müssen die Standards einer S2-Arbeit eingehalten werden.

Am Anfang muss für jede Zelle die optimale MOI (Multiplicity of infection; Testung mit 1, 3 und 10) bestimmt werden.

Zuerst werden die TZ gewaschen, abgelöst und anschließend einmal mit RPMI oder DMEM gewaschen. Nun werden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von  $2.5 \cdot 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Von den Zellen werden 200  $\mu$ l in ein 2 ml Eppendorf Gefäß pipettiert. Dann wird der Adenovirus, in den entsprechenden MOI, zu den Zellen gegeben. Die Menge an Virussuspension kann folgendermaßen berechnet werden:

Zellzahl ( $0,5 \cdot 10^6$ ) \* MOI (1, 3, 10) = Virusanzahl ( $x \cdot 10^6$ )

$$\frac{\text{Virusanzahl} * 1000 \mu\text{l}}{1100 * 10^6 \text{ PFU}} = \mu\text{l der Virussuspension}$$

(PFU= Plaque forming unit, Anzahl infektiöser Viren).

Die infizierten Zellen werden für 2 h bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend werden die Zellen in eine 6 well-Platte überführt, mit 5 ml Rxx10 aufgefüllt und für weitere 2-3 Tage inkubiert. Sie können dann für die entsprechenden Assays verwertet werden (MICA-Expression, CD107a-Degranulationsassay)

#### 2.1.10 Detektion von IgG-Antikörpern im Aszites durch ELISA

Die Durchführung des IgG-ELISAs erfolgt gemäß des Herstellerprotokolls. Demzufolge wird zunächst eine Nunc Maxi Sorp Platte mit 50  $\mu$ l/Well der Proben beimpft. Wenn nötig, können die Proben vorher mit R&D reagent diluent bzw. PBS/1 % BSA verdünnt werden (Hier 1:10 verdünnt). Je Probe sollten drei Wells angelegt werden, ebenso eine Kontrolle (Leer-Wert). Die Platte wird bei 4 °C für 12-18 Stunden inkubiert.

Am nächsten Tag wird die Platte drei Mal mit PBS+0,05 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wird die Platte mit je 200 µl/Well R&D reagent dilution geblockt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wird die Platte drei Mal gewaschen. Nun wird der Antikörper biotin mouse-anti-human IgG1 vorbereitet, indem dieser auf 100 ng/ml verdünnt und davon 50 µl /Well auf die Platte pipettiert wird. Die Platte wird für 2 Stunden bei RT inkubiert. Danach wird die Platte drei Mal gewaschen und anschließend mit 50 µl/Well HRPO-Streptavidin, welches 1:1000 verdünnt wurde, behandelt und für 30 min bei RT inkubiert. Dann wird die Platte drei Mal gewaschen und 100 µl/Well verdünntes TMB-Substrat auf die Proben gegeben (0,5 ml TMB + 10 ml TMB Puffer). Die Platte wird 5-30 min bei RT im Dunkeln inkubiert und je nach Farbzustand mit 50 µl/Well 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt. Abschließend wird die Platte bei 450 nm in einem Synergy Messgerät analysiert.

#### 2.1.11 Proteinchromatografie zur Isolation von Antikörpern aus Aszites

Zur Durchführung der Proteinchromatografie werden ein sogenannter Binding Buffer und der sogenannte Pierce Elution Buffer benötigt. Um den Binding Buffer herzustellen, wird eine Packung von BupH Phosphate Buffer Saline mit den pH 7,2 in 500 ml deionisiertem Wasser aufgelöst und steril filtriert. Zur Herstellung des Pierce Elution Buffer wird der Neutralization Buffer mit 1M Tris pH 9 angesetzt und anschließend steril filtriert. Die Aszitesproben werden auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt, evtl. enthaltene Feststoffe werden durch Zentrifugation oder Filtration entfernt.

Bevor die Säule benutzt wird, müssen alle Materialien auf RT gebracht werden und alle Flüssigkeiten entgast werden. Zuerst wird eine 10ml Einmalspritze mit 5-10 ml Binding Buffer befüllt. Anschließend wird die Säule durch 5-10 ml Binding Buffer (Fließgeschwindigkeit von ~1 ml/min) äquilibriert. Dann sollte eine 1 ml Spritze mit 320 µl der Probe befüllt und mit der Binding Buffer Spritze ausgetauscht werden. Die Probe wird mit der gleichen Fließgeschwindigkeit durch die Säule gedrückt und die Fraktion in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß aufgefangen. Dann wird die Säule mit 5-10 ml Binding Buffer gespült. Die Spülflüssigkeit kann verworfen werden. Danach wird eine 10 ml Spritze mit 5 ml Elution Buffer adaptiert. Dadurch werden die IgG1 Antikörper von der Säule gelöst und können in 1 ml Fraktionen aufgefangen werden. Die aufgefangenen Fraktionen müssen sofort mit 100 µl Neutralization Buffer pro 1 ml auf den physiologischen pH-Wert gebracht werden. Die Säule muss anschließend durch 3-5 ml Elution Buffer wieder regeneriert werden. Danach wird die Säule mit Binding Buffer reäquilibriert werden bis der pH-Wert wieder 7,2 beträgt.

Um die Säule zu lagern, muss diese nach der Reäquilibrierung mit 5 ml 0,02-0,05 % sodium azid haltigem Wasser durchgespült werden.

Die Konzentration der vorher eluierten Antikörper wurde mittels UV-Platte photometrisch bestimmt. Um ein besseres Volumen in dem Assay pipettieren zu können, wurden die Antikörper auf eine Konzentration von 500 µg/ml eingestellt.

## 2.1.12 Coomassie-Färbung zum Nachweis von IgG-Antikörpern

Um zu überprüfen, ob es sich bei den eluierten Antikörpern (s. Kap. 2.1.11) um Antikörper vom Typ IgG handelt, wurde eine elektrophoretische Auftrennung der Proben vorgenommen. Dadurch kann die Größe der Bestandteile in Kilodalton (kDa) angegeben und mit der molekularen Masse aus der Literatur verglichen werden. Somit ist es möglich, die Antikörperklasse zu bestimmen.

Zuerst ein SDS Gel angefertigt, welches aus einem Standardsammelgel und einem Trenngel mit 10 % Acrylamid besteht.

Trenngel:

Reagenzien	Volumen (ml)
Acrylamid	3,75
PAGE A	5,0
H <sub>2</sub> O	6,11
20 % SDS	0,075
TEMED	0,03
10 % APS	0,03

Tab. 7

Sammelgel:

Reagenzien	Volumen (ml)
Acrylamid	0,63
PAGE B	0,21
H <sub>2</sub> O	4,1
20 % SDS	0,025
TEMED	0,02
10 % APS	0,02

Tab. 8

Das Trenngel wird zwischen zwei Glasplatten (1 mm breiter Spalt) gegossen und für 20-30 min bei RT inkubiert. Anschließend wird das Sammelgel aufgeschichtet und mit eingesetztem Probenkamm für ca. 10 min bei RT inkubiert.

Dann wird die Laufkammer vorbereitet. Dazu wird das Gel in die entsprechende Halterung eingespannt (ggf. Dummy-Gel verwenden) und in die Kammer gehängt. Die Kammer wird mit 1xLaemmli Puffer gefüllt. Anschließend wird der Kamm entfernt und die Proben (10-40 µl), sowie ein Protein Ladder (Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder) können in die Taschen pipettiert werden. Das Gel wird zuerst für 15-20 min bei 100 V unter Spannung gesetzt, bis sich die Proben im Trenngel befinden. Dann wird die Spannung auf 200 V erhöht, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hat. Anschließend wird das Gel aus der Halterung genommen und von den Glasplatten abgelöst. Zur Auswertung muss nun das Gel fotografiert werden, damit der Protein Ladder später entsprechend beschriftet werden kann. Nun wird das Gel für 1 h mittels Coomassie fixation solution auf einem Schüttler fixiert. Danach wird die

Lösung durch eine Coomassie Färbung ausgetauscht und ebenfalls für 1 h auf einem Taumelschüttler inkubiert. Die Coomassie Färbung wird abgeschüttet und die Destaining Lösung auf das Gel gegeben. Dann wird das Gel auf dem Taumelschüttler inkubiert, bis ein guter Kontrast zwischen Banden und Hintergrund entsteht. Zum Auswerten wird das Gel auf einem Drucker eingescannt. Anschließend kann, durch das vorherige Bild, die Banden des Protein Ladders entsprechend des Herstellers beschriftet werden. Dadurch können die Proben in ihrer molekularen Masse bestimmt werden.

## 2.2 Material

### 2.2.1 Verwendete Antikörper, Isotypen und RNA

<b>Antikörper</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Klon</b>	<b>Konjugat</b>	<b>Hersteller</b>
Biotin Maus anti-Mensch IgG1, 0,5mg/ml Material No. 555869	Maus IgG2b, k	617-1		BD Pharmingen, BD Biosciences
Bv421 Maus anti-Mensch CD56, 12µg/ml, Lot: 6007717	Maus (MALB/c) IgG2b, k	NCAM 16.2	Bv421	BD Biosciences
FITC Maus anti-Mensch CD107a 0,5µg/test = 25µg/ml Lot: 6266751	Maus IgG1, k	H4A3	FITC	BD Pharmingen – BD Bioscience
HLA Class I (ABC) RPE, 200µg/ml	Maus IgG2a, k	W6/32	RPE	Dako
HLA-A Silencer seled pre designed siRNA 5nmole+water				Ambion
HLA-B Silencer seled pre designed siRNA 5nmole+water				Ambion
LEAF Purified anti-Mensch HLA-A, B, C, 1 mg/ml Lot: B148491		W6/32		BioLegend
MICA APC, 5µg/ml	Maus IgG2b	159227	APC	R6D Systems/biothane
Maus IgG2a PE, 50µg/ml		6155-178	PE	BD Biosciences
Maus IgG2b APC, 200µg/ml			APC	BD Biosciences
PE Maus Anti-Mensch EGF Receptor, 3µg/ml, Lot: 426933	Maus IgG2b, k	EGFR.1	PE	BD Bioscience
Purified Maus IgG2a, k isotype ctrl, 0,5 mg/ml Lot: B153642		MOPC-173		BioLegend
Silencer Select negative Control 5nmole+water				Ambion

Tab. 9

## 2.2.2 Aszites

Der Aszites stammt von Patientinnen der Frauenklinik des Universitätsklinikum Essen und wurde nach vorheriger Einwilligung im Rahmen der Primäroperation gewonnen. Diese Untersuchungen wurden durch ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen genehmigt (Ethikvotum-Nummer 14-5927-BO).

Die Aszites-Probe wurde direkt nach Entnahme in der Operation zentrifugiert und steril filtriert, um zelluläre Bestandteile zu entfernen. Für die vorliegende Arbeit wurden Proben von insgesamt 9 Patientinnen verwendet. Diese waren in der Zeit von 2011 bis 2017 akquiriert worden.

Aszites Nr. 1	Isolation 29.06.2011
Aszites Nr. 2	Isolation 09.08.2011
Aszites Nr. 3	Isolation 02.11.2011
Aszites Nr. 4	Isolation 28.03.2012
Aszites Nr. 5	Isolation 12.04.2012
Aszites Nr. 6	Isolation 18.04.2012
Aszites Nr. 7	Isolation 09.05.2012
Aszites Nr. 8	Isolation 22.03.2012
Aszites Nr. 9	Isolation 16.05.2017

Tab. 10

## 2.2.3 Verwendete Nanopartikel

NP	Calciumphosphat Nanopartikel (CaP-PEI-SiO-SH)
NP+FITC	Calciumphosphat Nanopartikel mit gekoppeltem Fluoresceinisothiocyanat (CaP-PEI-FITC-SiO-SH)
NP+Cet+FITC	Calciumphosphat Nanopartikel mit gebundenem Cetuximab und gekoppeltem Fluoresceinisothiocyanat (CaP-PEI-FITC-SiO-S-Cet)
NP+Cet	Calciumphosphat Nanopartikel mit gebundenem Cetuximab (CaP-PEI-SiO-S-Cet)
NP+sCet	Calciumphosphat Nanopartikel (CaP-PEI-SiO-SH) mit freiem Cetuximab (soluble)
NP+cRNA+Cet	Calciumphosphat Nanopartikel beladen mit Kontroll-RNA und gebundenem Cetuximab (CaP-PEI-RNA-SiO-S-Cet)
NP+siRNA+Cet	Calciumphosphat Nanopartikel beladen mit spezifischer siRNA und gebundenem Cetuximab (CaP-PEI-RNA-SiO-S-Cet)
NP Asc	Aszites welcher zuvor mit NP (CaP-PEI-SiO-SH) inkubiert wurde

Tab. 11

Die weiteren verwendeten Materialien und Reagenzien sind im tabellarischen Anhang aufgeführt.

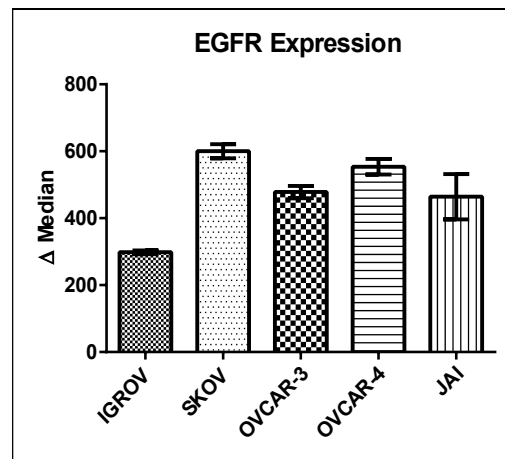
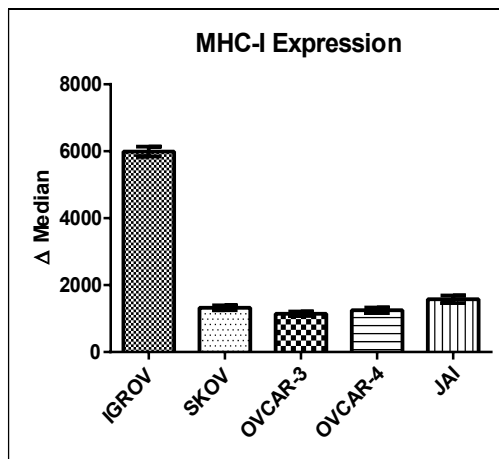
### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 NK-Zell-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen und Möglichkeiten ihrer Beeinflussung

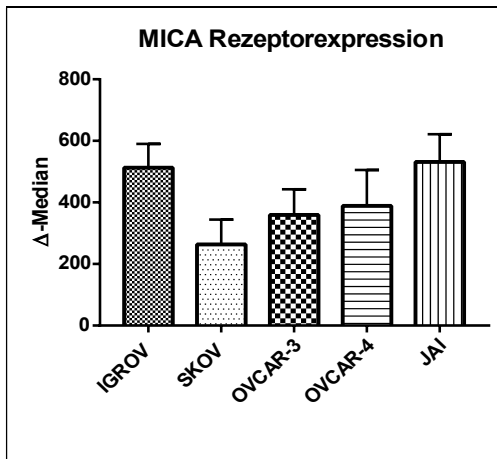
##### 3.1.1 Charakterisierung humaner Ovarialkarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer MHC-I-, EGFR- und MICA-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurden die humanen Ovarialkarzinomzellen IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-4 und JAI verwendet. Da die Oberflächenrezeptoren **EGFR**, **MHC-I** sowie **MIC A** entsprechende Zielstrukturen für die einzelnen Fragestellungen darstellten, wurden die genannten Zelllinien zunächst hinsichtlich ihrer EGFR-, MHC-I- und MIC A-Expression durchflusszytometrisch analysiert. Dabei war sowohl MHC-I, EGFR als auch MIC A auf allen Zelllinien exprimiert, jedoch in unterschiedlichem Ausmaß (Abb. 10a). IGROV-1 zeigte die stärkste Expression für MHC-I, die übrigen Zelllinien zeigten eine niedrigere, relativ ähnliche Ausprägung der MHC-I-Expression. Alle verwendeten Zelllinien waren EGFR-positiv, wobei die Expression bei SKOV-3 am stärksten, bei IGROV-1 am geringsten ausfiel. Ebenso war bei allen Zelllinien MIC A exprimiert, wobei IGROV-1 und JAI die stärkste Expression zeigten (Abb. 10a). Abb. 10b und 10c zeigen jeweils zwei repräsentative Experimente der MHC-I-bzw. EGFR-Expression.

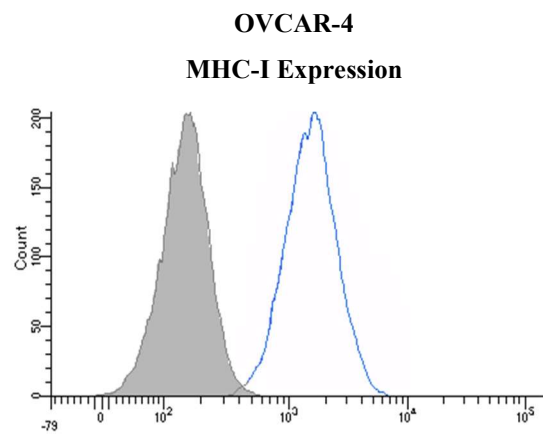
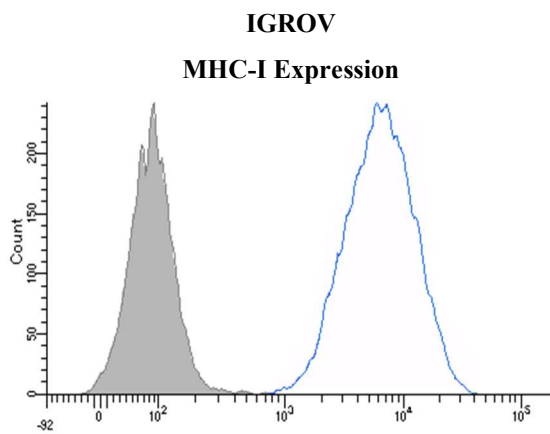
a



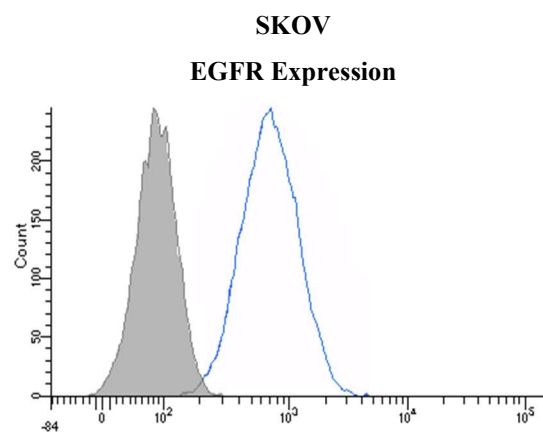
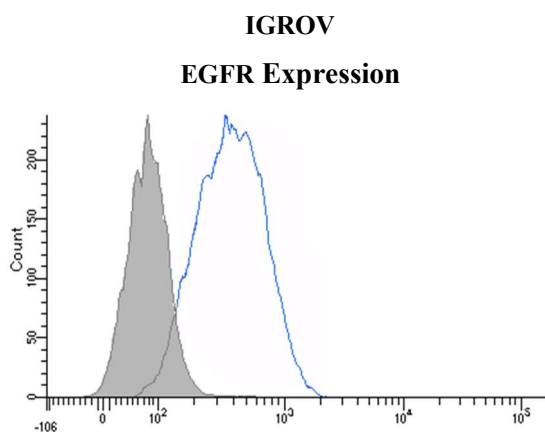




b



c

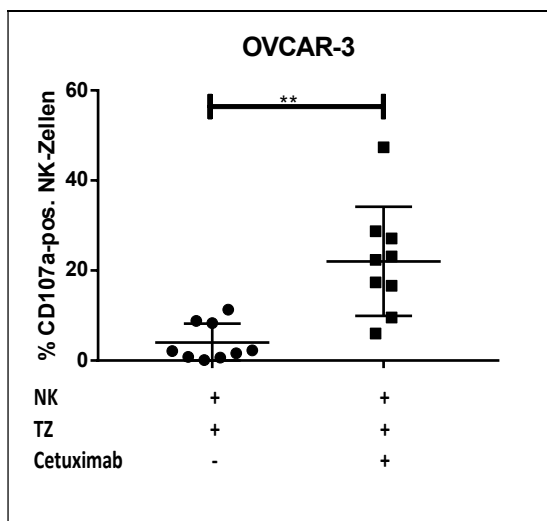


**Abb. 10: Bestimmung der MHC-I-, MIC A und EGFR-Expression.** Nach Markierung der Zellen mit den spezifischen Fluoreszenz-Antikörpern anti-MHC-I-PE, MICA-APC bzw. anti-EGFR-PE bzw. den jeweiligen Isotypen (IgG2a-PE, IgG2b-APC und IgG2b-PE) erfolgte eine Analyse der Expression der Oberflächenantigene im Durchflusszytometer. (a) Dargestellt im Balkendiagramm ist die mittlere

Fluoreszenzintensität ( $\Delta$  Median) der jeweiligen MHC-I-, EGFR- bzw. MIC A-Expression als Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). (b) und (c) In Histogrammen wird jeweils ein repräsentatives Experiment zur MHC-I-Expression (b) und EGFR-Expression (c) gezeigt. Die mittlere Fluoreszenzintensität ergibt sich dabei aus der Differenz der Expression des spezifischen Antikörpers (blaue Linie) und des dazugehörigen Isotyps (graue Fläche).

### 3.1.2 Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber humanen Ovarialkarzinomzellen

In den vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Ovarialkarzinomzellen eine ausgeprägte Resistenz gegenüber einer **NK-Zell-vermittelten natürlichen Zytotoxizität** aufweisen (Gottschalk et al., 2012). Dies kann jedoch durch Zugabe von Antikörpern, wie z.B. dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab, überwunden werden. Die Bindung von Cetuximab an die NK-Zelle führt zu einer NK-Zell-Aktivierung und signifikanten Steigerung der NK-Zell-Degranulation, was wiederum zu einer Verstärkung der zytotoxischen NK-Zell-Funktion führt (**Antikörper-vermittelte NK-Zell-Zytotoxizität, ADCC**) (Abb. 11).



**Abb. 11: Vergleich der natürlichen und der antikörper-vermittelten NK-Zytotoxizität (ADCC) bei Ovarialkarzinomzellen.** Tumorzellen (TZ) der Zelllinie OVCAR-3 wurden mit NK-Zellen (NK) zur Ermittlung der natürlichen Zytotoxizität bzw. in Kombination mit dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab zur Darstellung der ADCC inkubiert. Als Maß für die Degranulation wurde der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen [%] herangezogen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus 9 unabhängigen Experimenten (n=9) unter Angabe der statistischen Signifikanz (\*\*:  $p = <0,0332$ , Wilcoxon Test).

Um, wie in Abb.11 dargestellt, diese Zytotoxizität von NK-Zellen zu quantifizieren, wurde ein sogenannter Degranulations-Assay bzw. CD107a-Assay verwendet. CD107a wird bei der Vesikelausschüttung von NK-Zellen auf deren Oberfläche exprimiert und lässt sich durchflusszytometrisch bestimmen. Daher kann es als Maß für die NK-Zytotoxizität herangezogen

werden. Die im Folgenden dargestellten Experimente zeigen verschiedene Ansätze, wie eine NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität bzw. deren Antikörper-vermittelte Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen weiter gesteigert werden kann.

### 3.1.3 Möglichkeiten zur Modulation zytotoxischer NK-Zell-Funktionen

#### 3.1.3.1 Hochregulation von MIC A

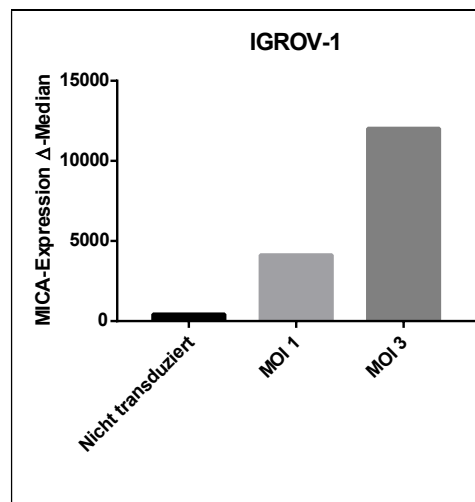
**MIC A** gehört zu der Gruppe der NKG2D-Liganden und fungiert als Stressprotein. NK-Zellen können eine Überexpression dieses Proteins auf Zielzellen erkennen und dadurch aktiviert werden, was zur Eliminierung der entsprechenden Zelle führt.

Im nachfolgenden Experiment wurde überprüft, ob durch eine artifizielle Hochregulation von MIC A eine Verstärkung der zytotoxischen NK-Zell-Funktion zu erreichen ist. Dabei wurden methodisch zwei Verfahren angewandt, die Transfektion von Plasmiden und die virale Transduktion.

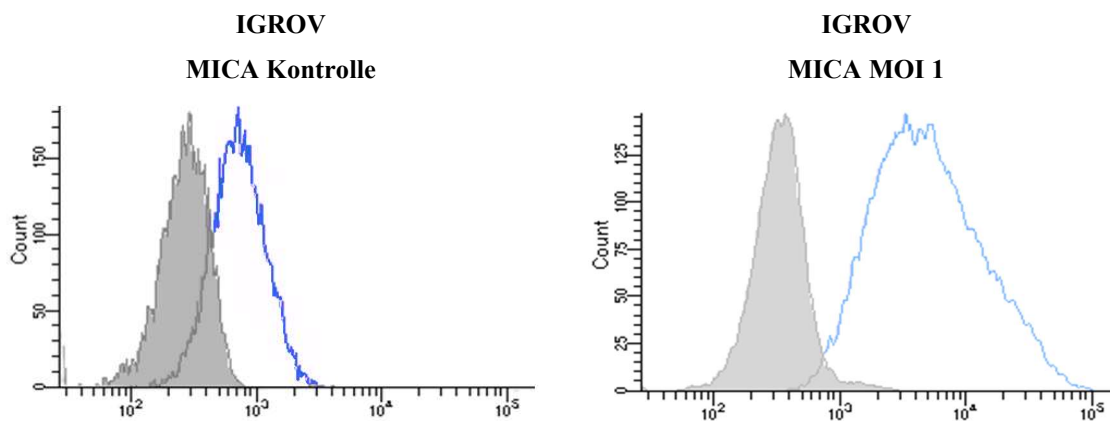
Die **Transfektion** wurde mit bakteriellen Expressionplasmiden, welche für das humane MIC A kodieren, und Lipofectamin 2000 als Transfektionsreagenz durchgeführt. Um die optimalen Bedingungen zu evaluieren, wurden 5 verschiedene Zelllinien an Tag 0 für 6h transfiziert und anschließend 1-4 Tage inkubiert. An jedem Tag wurde eine durchflusszytometrische Bestimmung der MIC A-Expression auf den Zellen vorgenommen. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine konsistente Hochregulation von MIC A nach Transfektion (Ergebnisse nicht gezeigt). Daraus resultierend wurden keine weiteren Transfektionsversuche mit Lipofectamin und MIC A-DNA vorgenommen.

Die nachfolgend durchgeführte **Transduktion** erfolgte mittels Adenoviren, worüber ein definiertes DNA-Fragment in die Zielzelle eingeschleust werden soll. Dieses wird in das vorhandene Genmaterial integriert und abgelesen, wodurch die Expression von MIC A beeinflusst werden soll. Um die optimalen Bedingungen festzulegen, wurden zwei verschiedene multiplicity of infections (MOI 1 und 3) getestet, wobei letztlich MOI 1, aufgrund der Ressourcen und ebenfalls erfolgreichen Hochregulation für die weiteren Experimente verwendet wurde. Zur Überprüfung wurde anschließend die MIC A-Expression durchflusszytometrisch bestimmt. Wie Abb. 12 a+b veranschaulicht, zeigten alle Zelllinien ebenfalls eine gute Sensitivität und eine starke Hochregulation von MIC A.

a

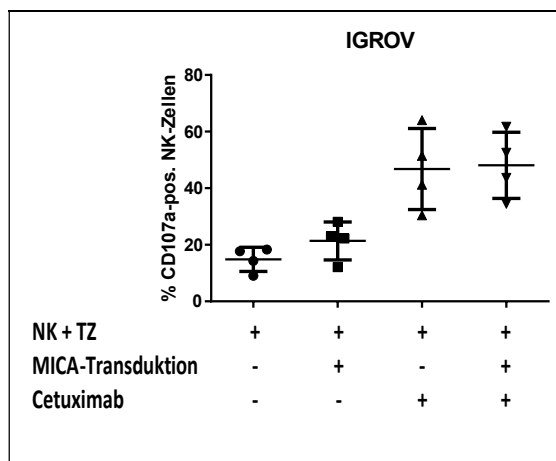


b



**Abb. 12: MICA-Expression von IGROV-1 vor und nach Transduktion von MIC A.** Quantitative Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität der MIC A-Expression eines repräsentativen Experimentes nach Transduktion im Balkendiagramm (a) und im Histogramm (b). Zur Hochregulation von MIC A wurden IGROV-1-Zellen mit einem MIC A-haltigen Adenovirus transduziert. Die Histogramme zeigen sowohl Isotyp-Färbung (graue Fläche) als auch MIC A-APC-Färbung als Kontrolle (blaue Linie) sowie im Overlay für MOI-1 (hellblaue Linie).

Um die Konsequenz einer der MIC A-Hochregulation in den Zielzellen auf die NK-Zytotoxizität zu überprüfen, wurden im Anschluss NK-Zellen im Rahmen eines Degranulationsassays koinkubiert. Wie Abb. 13 veranschaulicht, führte eine Erhöhung der MIC A-Expression lediglich tendenziell zu einer verstärkten natürlichen NK-Zytotoxizität (statistisch nicht signifikant), die ADCC blieb hingegen unbeeinflusst.



**Abb. 13: NK-Zytotoxizität nach MIC A-Transduktion.** CD107a-Degranulationsassay mit NK-Zellen (NK) und IGROV-1-Tumorzellen (TZ) nach Transduktion (MIC A-Transduktion) in An- und Abwesenheit von Cetuximab. Die Ordinate zeigt den prozentualen Anteil der CD107a-positiven Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung von 4 unabhängigen Experimenten. (n=4), statistischer Test: Wilcoxon Test.

Da somit die zytotoxische NK-Zell-Funktion gegenüber Ovarialkarzinomzellen zumindest nicht in der vorliegenden Arbeit über MIC A zu regulieren war, wurde dieser methodische Ansatz nicht weiterverfolgt.

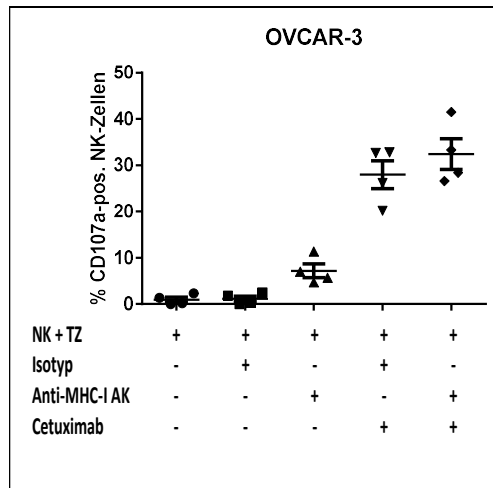
### 3.1.3.2 Modulation der MHC-I Expression

#### 3.1.3.2.1 Modulation der NK-Toxizität durch anti-MHC-I-Antikörper

Die Aktivierung von NK-Zellen ist durch verschiedene Mechanismen möglich. Neben der Erkennung von MIC A stellt ein weiterer relevanter Mechanismus für die NK-Zell-Aktivierung die Erkennung der Rezeptorexpression von MHC-I auf Zielzellen dar. Wenn die Rezeptordichte von MHC-I abnimmt, wird dieses von NK-Zellen erkannt, was zu einer Eliminierung der Zielzelle führt („missing-self“-Hypothese).

Daher wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob durch den Einsatz inhibierender anti-MHC-I-Antikörper eine Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität zu erreichen ist. Die NK-Zytotoxizität in Anwesenheit inhibierender anti-MHC-I-Antikörper wurde wiederum im Rahmen eines CD107a-Degranulationsassays quantifiziert.

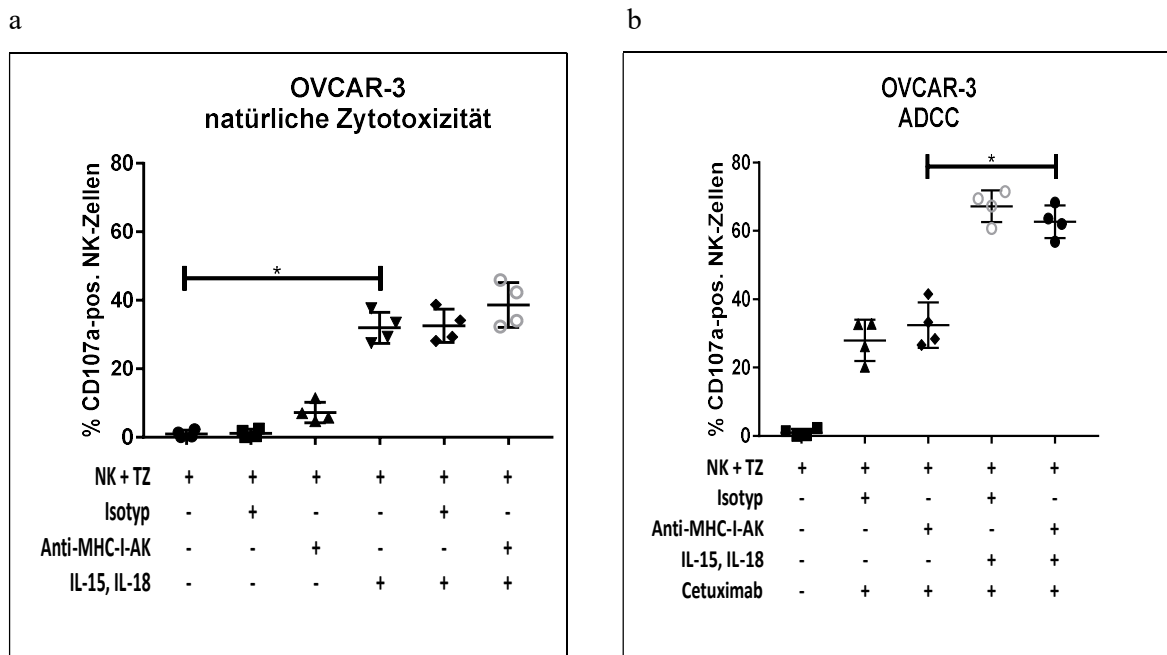
Unseren Daten zufolge (Abb. 14) ließ sich tendenziell zwar eine Erhöhung der natürlichen Zytotoxizität durch die MHC-I-Inhibierung erzielen, diese war jedoch nicht statistisch signifikant. Dies konnte bei allen sechs Zelllinien beobachtet werden. Nach Zugabe von Cetuximab wiesen die Zelllinien ein heterogenes Verhalten auf, ca. 50 % der Zelllinien zeigten eine tendenziell erhöhte, aber statistisch nicht signifikante Verstärkung der ADCC.



**Abb. 14 Natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC bei OVCAR-3 nach MHC-I-Inhibition.** NK-Zellen (NK), OVCAR-3-Tumorzellen (TZ) +/- Cetuximab wurden in Anwesenheit des anti-MHC-I-Antikörpers (AK) (10µg/ml) bzw. des zugehörigen Isotypen IgG2a koinkubiert. Danach wurden die NK-Zellen im Rahmen des Degranulationsassays mit anti-CD107a-FITC markiert und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen als Mittelwerte mit Standardabweichung aus 4 unabhängigen Experimenten (n=4), statistischer Test: Wilcoxon-Test

Nachfolgend wurde überprüft, ob durch eine vorherige Stimulierung der NK-Zellen mittels Zytokine eine Verstärkung der Zytotoxizität zu erreichen war. Dazu wurden die Zellen für 2 Tage mit 100 U/ml IL-15, sowie 10 ng/ml IL-18 stimuliert. Anschließend erfolgte eine Koinkubation mit Tumorzellen, die zuvor mit den inhibitorischen anti-MHC-I-Antikörpern behandelt worden waren. Im Rahmen eines Degranulationsassays wurde die zytotoxische NK-Zellaktivität im Durchflusszytometer analysiert (s. Abb. 15).

Wie Abb. 15a veranschaulicht, führte eine Vorstimulierung der NK-Zellen mit IL-15 und IL-18 zu einer signifikanten Steigerung der natürlichen Zytotoxizität. Anti-MHC-I bewirkte bei stimulierten NK-Zellen eine tendenzielle Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität, auch wenn diese keine statistische Signifikanz erreichte. Die ADCC stellt sich bei vorstimulierten NK-Zellen im Vergleich zu unstimulierten NK-Zellen signifikant stärker dar (Abb. 15b), bei Einsatz des anti-MHC-I-Antikörpers zeigt sich jedoch keine weitere Steigerung.



**Abb. 15: Natürliche Zytotoxizität (a) und ADCC (b) von stimulierten NK-Zellen gegenüber OVCAR-3-Zellen nach Behandlung mit anti-MHC-I-Antikörpern.** Unstimulierte und IL-15-/IL-18-stimulierte NK-Zellen (NK) wurden mit OVCAR-3-Tumorzellen (TZ) ohne Cetuximab (a) bzw. in Anwesenheit von Cetuximab (b) mit anti-MHC-I-Antikörpern bzw. dem Isotyp IgG2a im Rahmen eines Degranulationsassays koinkubiert und nach Hinzugabe von anti-CD107a-FITC durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte mit der Standardabweichung CD107a-positiver NK-Zellen [%] aus 4 unabhängigen Experimenten (n=4). Eine statistische Signifikanz (\*) nach Wilcoxon Test wurde angenommen bei \*:  $p < 0,05$ .

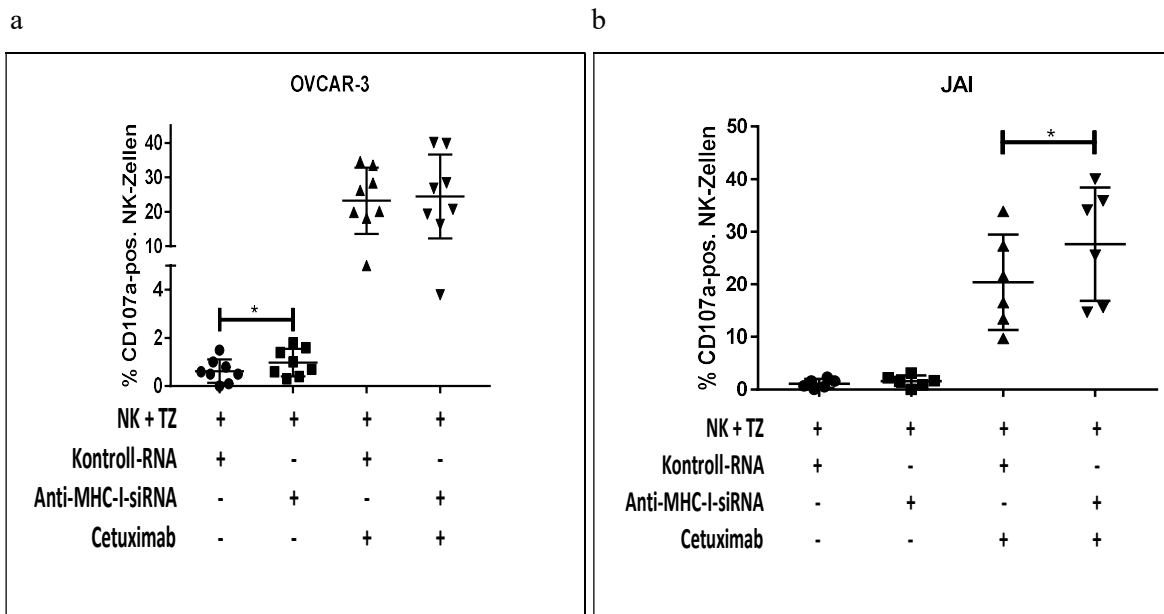
Grundsätzlich legen die Experimente mit inhibierenden Anti-MHC-I-Antikörpern nahe, dass über diesen Mechanismus unter Umständen eine gewisse Modulation der NK-Zytotoxizität zu erzielen ist. Daher wurde nachfolgend überprüft, ob über eine effektive Runterregulierung des MHC-I-Komplexes durch inhibitorische siRNA mittels einer Transfektion eine Verstärkung der NK-Zytotoxizität zu erreichen ist.

### 3.1.3.2.2 Modulation der MHC-I-Expression durch inhibitorische RNA (siRNA) mittels Transfektion

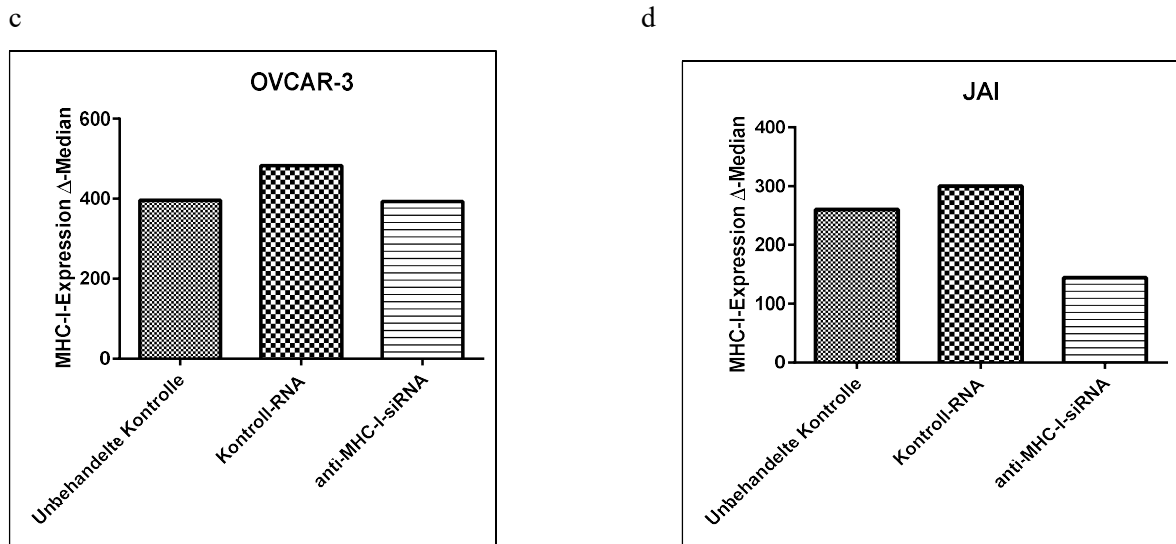
Da sich durch den Einsatz inhibitorischer anti-MHC-I-Antikörper eine tendenzielle Verstärkung der Degranulation von NK-Zellen feststellen ließ, sollte nachfolgend über eine Transfektion mit anti-MHC-I-siRNA eine Runterregulierung von MHC-I in den Tumorzellen erzielt werden. Als Transfektionsreagenz diente Lipofectamin, dessen optimale Konzentration im Rahmen verschiedener Vorversuche ermittelt worden war. Als Kontrolle wurde eine non-sense-RNA verwendet, um unspezifische RNA-Wirkungen auszuschließen.

Ziel des nachfolgenden experimentellen Ansatzes war, zu überprüfen, ob sich die zytotoxische NK-Aktivität gegenüber Ovarialkarzinomzellen, deren MHC-I-Expression durch Transfektion runterreguliert war, steigern lässt. Dazu wurden sechs verschiedene Ovarialkarzinomzelllinien sowie zwei unterschiedliche Konzentrationen des Transfektionsreagenz Lipofectamin verwendet. Es erfolgte die Anwendung von Lipofectamin und RNA sowohl in dem Verhältnis 0,5:1 als auch 1:1. Bei jeder Zelllinie wurde durchflusszytometrisch die MHC-I-Rezeptorexpression nach Transfektion überprüft.

Bei der Versuchsreihe mit dem Verhältnis 0,5:1 zeigten bis auf IGORV-1 alle Zelllinien eine Runterregulation von MHC-I (s. Abb. 16 c+d). Nachfolgend wurden die transfizierten Tumorzellen im Rahmen eines Degranulationsassays mit NK-Zellen inkubiert. Hier zeigten allerdings drei der fünf Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV-3, IGROV-1, OVCAR-4) keine Veränderung der NK-Zytotoxizität (Expression von CD 107a), weder in der natürlichen Zytotoxizität noch in der ADCC. Nur bei den Linien OVCAR-3 und JAI traten signifikante Veränderungen auf (Abb. 16). Tumorzellen der Linie OVCAR-3 zeigten eine geringe, wenn auch statistisch signifikante Zunahme der Sensibilität gegenüber natürlicher NK-Zell-Zytotoxizität (Abb.16a), allerdings gelang hier die Runterregulation von MHC-I nur unzureichend (Abb. 16c). Dagegen wurde in der Linie JAI eine suffiziente Runterregulation von MHC-I erreicht (Abb. 16d), was eine signifikante Verstärkung der ADCC zur Folge hatte (Abb. 16b).

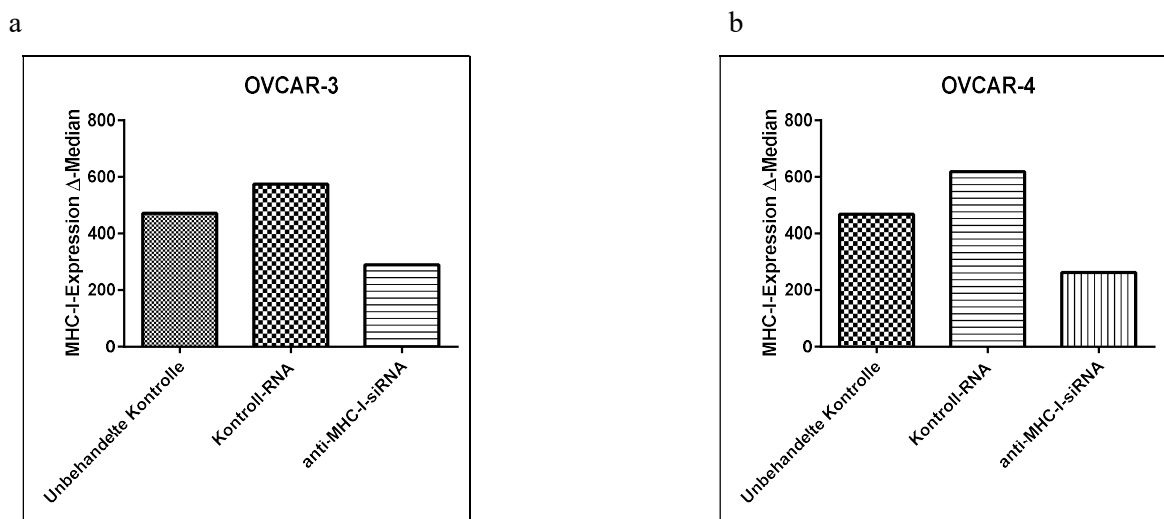






**Abb. 16: Natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC nach Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit anti-MHC-I-RNA und zugehöriger MHC-I-Rezeptorexpression.** OVCAR-3-Tumorzellen (TZ) (a, c) bzw. JAI-I (b, d) wurden mit anti-MHC-I-RNA transfiziert (Verhältnis Lipofectamin-siRNA: 0,5:1) und mit NK-Zellen (NK) +/- Cetuximab inkubiert. Nach Durchführung eines Degranulationsassays wurden die NK-Zellen hinsichtlich ihrer CD107a-Expression im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der CD107a-positiven NK-Zellen aus 6-8 unabhängigen Experimenten (a+b) sowie die zugehörige MHC-I-Rezeptorexpression ( $\Delta$ -Median) eines repräsentativen Experiments nach Transfektion (c+d). Statistische Signifikanz nach Wilcoxon-Test (\*) angenommen bei \*:  $p < 0,05$ .

Durch Verwendung einer höheren Lipofectamin-Konzentration (Verhältnis zur siRNA: 1:1) konnte eine weitere Runterregulation von MHC-I erreicht werden (Abb. 17). Bei IGROV-1 ließ sich erneut nur eine minimale Runterregulation erzielen, wohingegen die anderen vier Zelllinien (SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-4, JAI) eine suffiziente Runterregulation von MHC-I aufwiesen.



**Abb. 17: MHC-I-Rezeptorexpression nach Transfektion mit anti-MHC-I-siRNA.** OVCAR-3-Tumorzellen (a) bzw. OVCAR-4 (b) wurden mit anti-MHC-I-RNA transfiziert (Verhältnis Lipofectamin-siRNA: 1:1).

Dargestellt ist, die Rezeptorexpression von MHC-I ( $\Delta$ -Median) eines repräsentativen Experiments nach erfolgter Transfektion.

Im Gegensatz zu den vorherigen Experimenten mit geringerer Lipofectaminkonzentration wurde hier allerdings die natürliche Zytotoxizität keiner Zelllinie beeinflusst. Bei drei Zelllinien konnte tendenziell eine Verstärkung der ADCC durch den Einsatz der MHC-I-siRNA dokumentiert werden, eine statistische Signifikanz wurde allerdings nicht erreicht (Abbildung nicht gezeigt).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Expression von MHC-I in den einzelnen Ovarialkarzinomzelllinien über eine Transfektion von anti-MHC-I-siRNA in unterschiedlichem Maße beeinflussen ließ. Nicht in allen Zelllinien war eine suffiziente Runterregulation zu erreichen. Bei den Zelllinien (z.B. JAI), bei denen MHC-I nach Transfektion deutlich runterreguliert war, war eine statistisch signifikante Zunahme der ADCC zu beobachten. Auffällig war allerdings, dass die natürliche NK-Zytotoxizität in der überwiegenden Anzahl der Experimente unbeeinflusst blieb. Im Gegensatz dazu war beim Einsatz inhibitorischer anti-MHC-I-Antikörper in erster Linie eine Veränderung der natürlichen NK-Zytotoxizität zu beobachten.

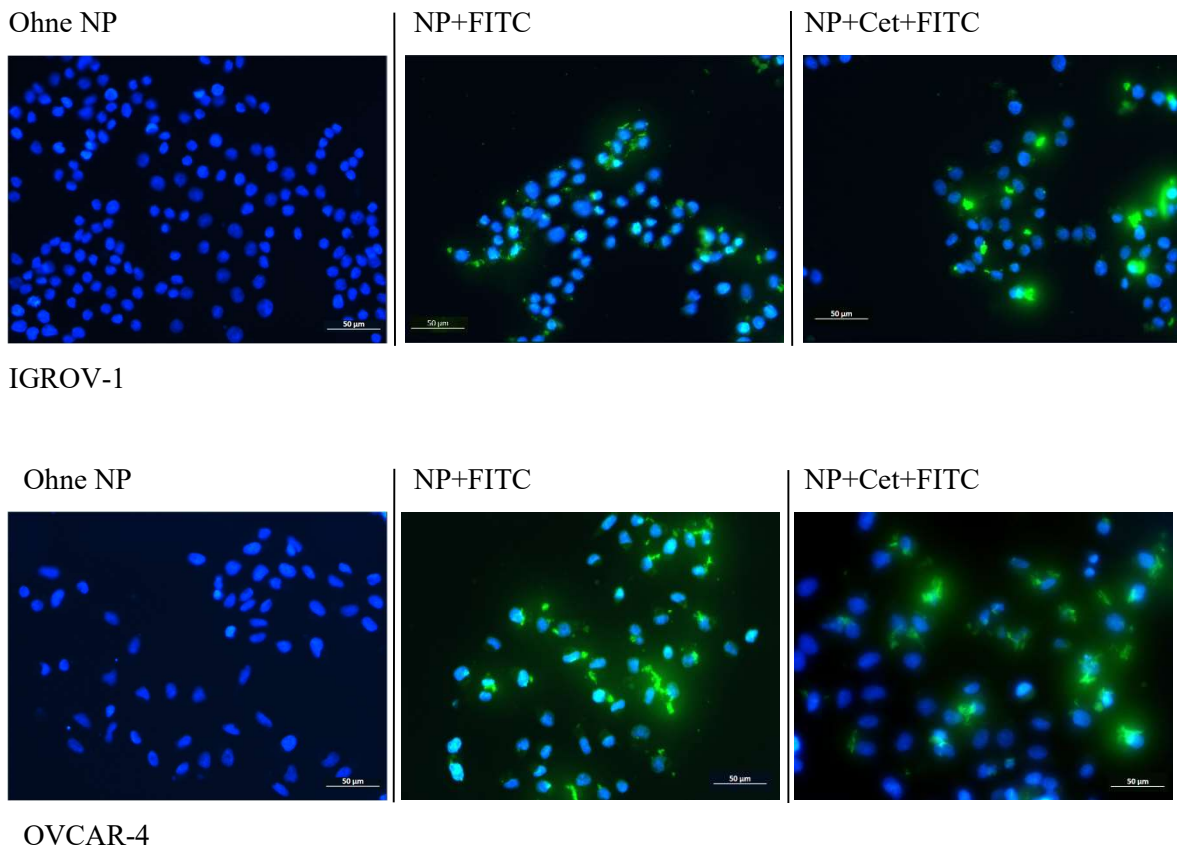
### 3.1.3.3 Einsatz funktionalisierter Calciumphosphat Nanopartikel

Calciumphosphat Nanopartikel (NP) werden immer häufiger auch klinisch angewandt. Da diese NP eine gute Biokompatibilität und geringe Zytotoxizität aufweisen und durch Beladung mit Cargomolekülen bzw. Bindung an spezifische Antikörper funktionalisiert werden können, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwieweit Calciumphosphat-NP geeignet sind, als zusätzliches Tool NK-Zell-Funktionen zu modulieren. Dabei sollte schwerpunktmäßig untersucht werden, ob Nanopartikel selbst eine modulierende Wirkung auf die NK-Tumorzell-Interaktion ausüben und ob sie als Transfektionsreagenz mit inkludierter anti-MHC-I-siRNA eine ausreichende Herunterregulation von MHC-I bewirken und so zu einer Steigerung der NK-Zell-Zytotoxizität beitragen können. Zusätzlich wurde überprüft, ob funktionalisierte Partikel durch Bindung von Cetuximab zytotoxische NK-Zell-Funktionen beeinflussen können.

#### 3.1.3.3.1 Aufnahme von Fluoreszenz-markierten Nanopartikeln in Tumorzellen

Zunächst wurde an zwei verschiedenen Zelllinien (IGROV-1, OVCAR-4) die Aufnahme von Calciumphosphat-NP überprüft, bevor diese als Transfektionsreagenz eingesetzt wurden. Eine Markierung der NP mit dem Fluorochrom FITC ermöglichte dabei eine Visualisierung. Ebenfalls sollte überprüft werden, ob die Kopplung von Cetuximab an die Partikel die Aufnahme in die Zellen noch weiter steigern kann. Daher wurden zwei Arten von NP verwendet. Zum einen NP+FITC und

zum anderen NP+Cet+FITC. Die Tumorzellen selbst wurden mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Dapi eingefärbt, visualisiert und anschließend mikroskopisch ausgewertet (Abb. 18).



**Abb. 18: Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Nanopartikeln mit und ohne konjugiertem Cetuximab.** Tumorzellen (TZ) von IGROV-1 und OVCAR-4 wurden 3h mit fluoreszenzmarkierten NP inkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Links sind TZ ohne NP dargestellt (Kontrolle), in der Mitte wurden die Tumorzellen mit NP+FITC, rechts mit funktionalisierten Cetuximab (NP+Cet+FITC) inkubiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. Mikroskopiert wurde mit dem Axioskop 2 von Zeiss mit einer 40-fachen Vergrößerung. Die mittlere Uptakerate von NP+ FITC liegt bei IGROV-1 bei ca. 56 % und beträgt bei OVCAR-4 ca. 57 %. Bei den NP+Cet+FITC liegt diese bei IGROV-1 bei ca. 27 % und bei OVCAR-4 um die 34 %. (Angaben als relative Prozentzahl durch Auszählung ermittelt).

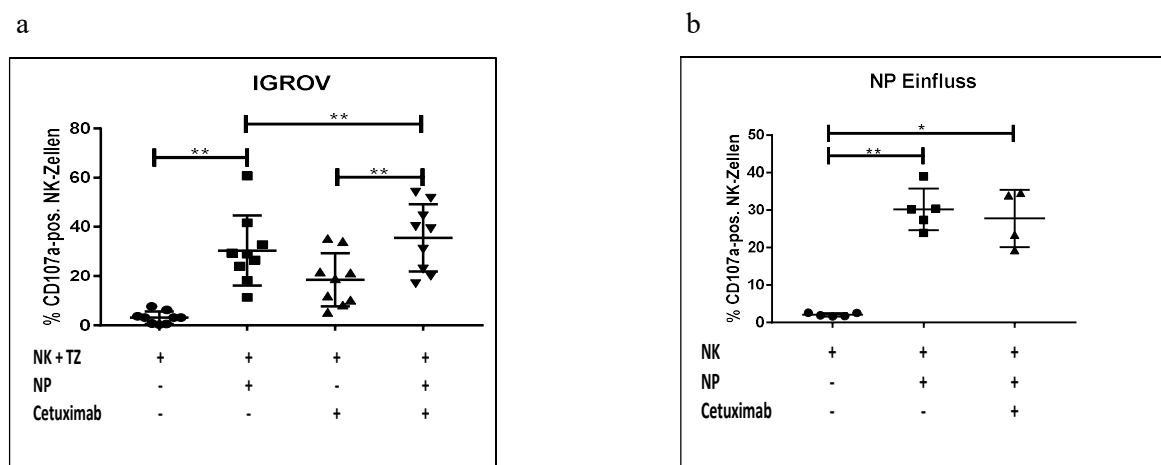
Wie Abb. 18 veranschaulicht, waren aufgenommene NP vor allem im Zytoplasma der Tumorzellen lokalisiert. Cetuximab-funktionalisierte NP (NP+Cet) neigten vermehrt zur Aggregation, wurden jedoch ebenfalls von den Zellen aufgenommen. Die Aufnahme der NP ohne Antikörper war jedoch deutlich effizienter als bei NP+Cet. Die Aufnahme der Partikel erschien unspezifisch, ein spezifisches, Antikörper-vermitteltes targeting der Partikel konnte nicht beobachtet werden. Beim Vergleich der Ovarialkarzinomzelllinien fiel auf, dass diese eine unterschiedliche Aufnahmefrequenz zeigten: Die NP wurden von OVCAR-4-Zellen in höherem Maße aufgenommen als von IGROV-1-Zellen.

Zusammenfassend wurden Calciumphosphat-NP ausreichend von Ovarialkarzinomzellen aufgenommen, wodurch sie sich grundsätzlich als Transfektionsreagenz eignen könnten. Jedoch konnte nicht bestätigt werden, dass durch die Kopplung spezifischer Antikörper an Nanopartikel eine bessere Zielrichtung (targeting) der Partikel erreicht werden konnte.

### 3.1.3.3.2 Einfluss von Calciumphosphat-Nanopartikel auf die NK-Zellaktivität

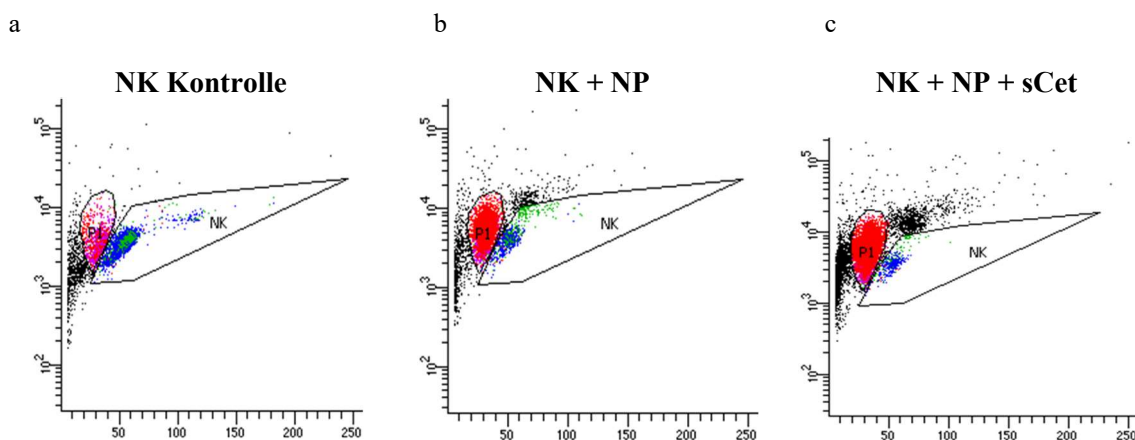
Nachfolgend sollte überprüft werden, welche Auswirkungen eine Koinkubation von Calciumphosphat-NP auf die zytotoxische Funktion von NK-Zellen hat. Dazu wurden leere, nicht-funktionalisierte NP direkt in den Assay eingesetzt. Der experimentelle Aufbau folgte dem bisherigen Protokoll eines Degranulations-Assays. Das Experiment verfolgte zwei Ansätze: Zum einen sollte der Einfluss der NP auf die zytotoxische Funktion von NK-Zellen in Anwesenheit von Tumorzellen (IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-4) dargestellt werden, zum anderen sollten auch mögliche Effekte von NP auf NK-Zellen selbst, in Abwesenheit von Tumorzellen untersucht werden. Wie in Abb. 19a dargestellt, resultierte die Zugabe von Calciumphosphat-NP zu einer Kokultur aus NK- und Tumorzellen in einer signifikanten Steigerung, sowohl der natürlichen als antikörpervermittelten Zytotoxizität (ADCC). Dieses Verhalten konnte in allen drei Zelllinien reproduziert werden.

In Abb. 19b wird der Effekt von Nanopartikeln auf NK-Zellen in Abwesenheit von Zielzellen dargestellt. Unseren Daten zufolge führte eine Inkubation von NK-Zellen mit NP zu einer signifikanten Steigerung ihrer spontanen Degranulation. Die Nanopartikel schienen in diesem Versuchsansatz gleichermaßen als Target zu fungieren und die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen anzuregen. Die Zugabe von ungebundenem Cetuximab blieb hier ohne Effekt. Bei Verwendung von CaP-NP mit daran gebundenem Cetuximab, konnte ebenfalls keine Verstärkung der Degranulation erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 19a: Einfluss von NP auf die natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC.** NK-Zellen (NK) und Tumorzellen (TZ) wurden mit Nanopartikeln (NP) +/- Cetuximab inkubiert und nach Markierung mit anti-CD107a-FITC durchflusszytometrisch analysiert. Repräsentativ wird die Zelllinie IGROV-1 gezeigt. Dargestellt ist der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen [%] als Maß für natürliche Zytotoxizität bzw. ADCC. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 9 unabhängigen Experimenten (n=9). Statistische Signifikanz (\*) nach Wilcoxon-Test \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,0332$

**Abb. 19b: NP-Einfluss auf NK-Zellen in Abwesenheit von TZ.** NK-Zellen (NK) wurden mit NP +/- Cetuximab inkubiert, anti-CD107a-markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen [%] als Mittelwerte und Standardabweichung aus 4-5 unabhängigen Experimenten (n=4-5). Statistische Signifikanz nach Mann-Whitney Test \*:  $p = 0,0159$ ; \*\*:  $p = 0,0079$



**Abb. 20: Durchflusszytometrische Messung der NK-Zell-Degranulation nach Inkubation mit Nanopartikeln.** NK-Zellen wurden mit NP +/- Cetuximab für 1h inkubiert, mit anti-CD107a-FITC markiert und nach Durchführung eines Degranulationsassays durchflusszytometrisch analysiert.

Dargestellt ist im Rahmen der FACS-Messung im forward/sideward-scatter (FSC/SSC) die NK-Zellpopulation (blau) in Anwesenheit von NP +/- Cetuximab (Cet). Das Panel (a) dient der Kontrolle (NK allein), in Panel (b) werden NK-Zellen nach Inkubation mit NP dargestellt, im Panel (c) NK-Zellen mit NP und zugegebenen Cetuximab (sCet). Zur NK-Zellpopulation (blau) demarkiert sich nach Zugabe von NP eine weitere Population (P1, rot) in (b+c).

Bei der durchflusszytometrischen Analyse entstand der Eindruck, dass NK-Zellen nach Inkubation mit NP an Übergranulation zugrunde gehen. Im forward/sideward scatter (s. Abb. 20) demarkierte sich neben der NK-Zellpopulation eine weitere Population (P1, rot), die absterbenden NK-Zellen entsprechen könnte.

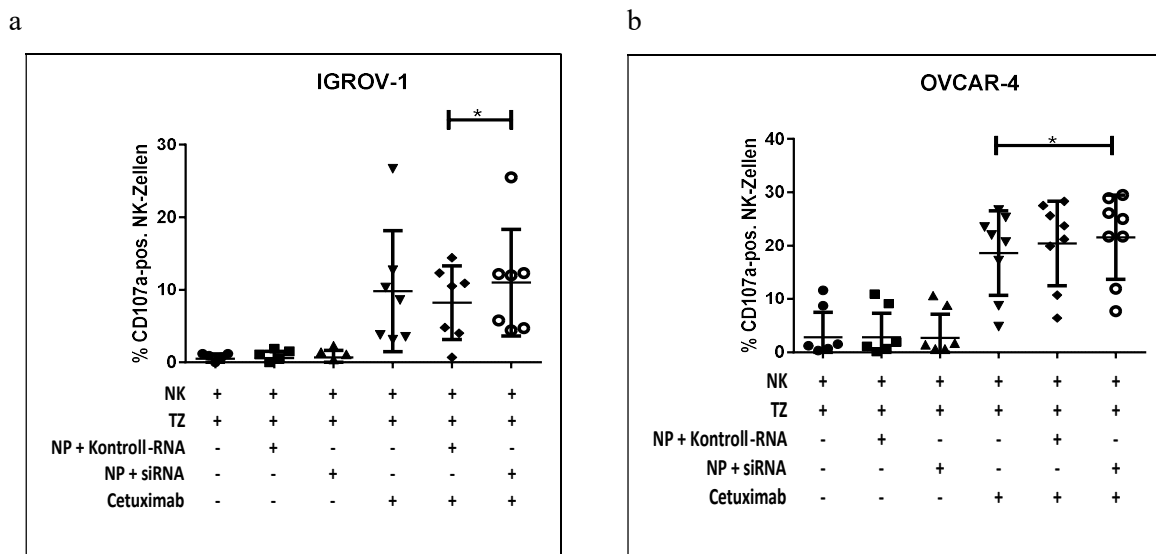
Zusammenfassend führen nicht-funktionalisierte Calciumphosphat-NP in unseren Untersuchungen zu einer signifikanten Steigerung der natürlichen und Antikörper-abhängigen NK-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen. Interessanterweise werden auch NK-Zellen allein, in Abwesenheit der Tumorzellen signifikant durch diese Partikel aktiviert. Calciumphosphat-NP

können unseren Daten zufolge offenbar selbst als target für NK-Zellen fungieren und eine starke, unspezifische Immunantwort in NK-Zellen auslösen.

Anhand der bisher dargestellten Daten konnte gezeigt werden, dass CaP-NP zum einen adäquat von Ovarialkarzinomzellen aufgenommen werden und sich somit als Transfektionsreagenz eignen könnten. Im Gegensatz zu Lipofectamin hätten CaP-NP den Vorteil, dass sie auch in vivo angewendet werden könnten. Zum anderen konnte dargestellt werden, dass die Partikel selbst in der Lage sind, eine unspezifische NK-Zellaktivierung auszulösen. Sie sind aber offensichtlich auch in der Lage, eine spezifische antitumorale NK-Zell-Antwort wie die NK-Zytotoxizität zu verstärken, was im Rahmen eines immuntherapeutischen Modells zur NK-Zell-Modulation von Vorteil sein könnte. Daher wurde im folgenden experimentellen Ansatz überprüft, ob eine zusätzliche Integration von inhibierender anti-MHC-I-siRNA in Nanopartikel über eine Herunterregulation von MHC-I auf Tumorzellen zu einer weiteren Aktivierung von NK-Zellen führen würde.

### 3.1.3.3.3 NK-Zell-Zytotoxizität nach Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit anti-MHC-I-siRNA-enthaltenden Calciumphosphat-Nanopartikel

Im Folgenden wurde überprüft, ob sich CaP-NP als Transfektionsreagenz zur Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit anti-MHC-I-siRNA eignen. Dieses Experiment wurde an drei verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien (IGROV-1, OVCAR-3, OVCAR-4) durchgeführt. Nach Transfektion wurde die Änderung der MHC-I-Expression entsprechend durchflusszytometrisch überprüft. Im Anschluss wurde im Rahmen eines Degranulationsassays untersucht, ob diese transfizierten Ovarialkarzinomzellen in der Lage waren, die zytotoxische NK-Zellaktivität zu steigern. Dazu wurden NK-Zellen mit NP-anti-MHC-I-transfizierten Tumorzellen +/- Cetuximab und nicht-transfizierten Tumorzellen (Kontrolle) +/- Cetuximab koinkubiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 21).



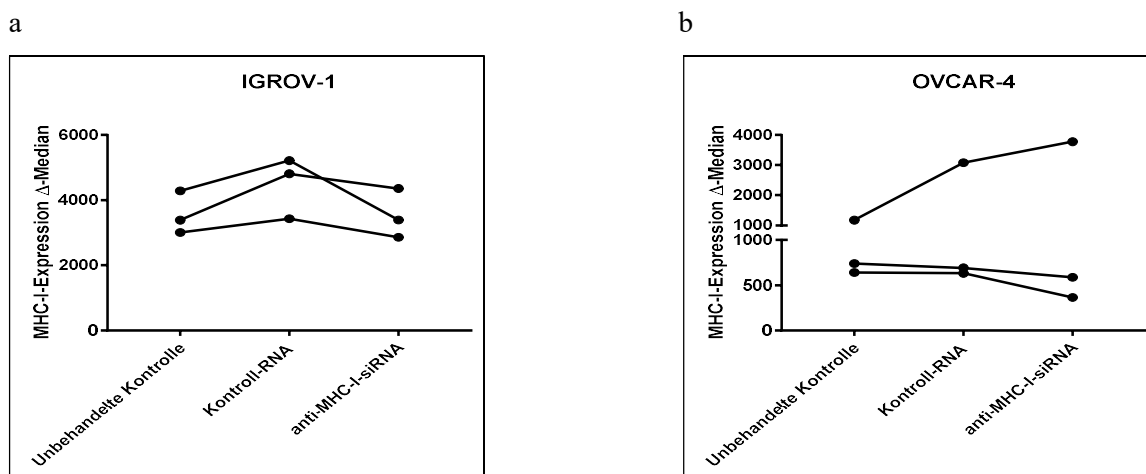
**Abb. 21: Natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC gegenüber anti-MHC-I-NP-transfizierten Ovarialkarzinomzellen.** IGROV-1- (a) bzw. OVCAR-4-Tumorzellen (b) wurden mit anti-MHC-I-RNA-haltigen NP transfiziert und mit NK-Zellen (NK) +/- Cetuximab inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Tumorzellen. Nach Durchführung eines Degranulationsassays wurden die NK-Zellen hinsichtlich ihrer CD107a-Expression im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der CD107a-positiven NK-Zellen [%] aus 7-8 unabhängigen Experimenten (n=7-8). Statistische Signifikanz (\*) nach Wilcoxon-Test angenommen bei  $p < 0,05$ .

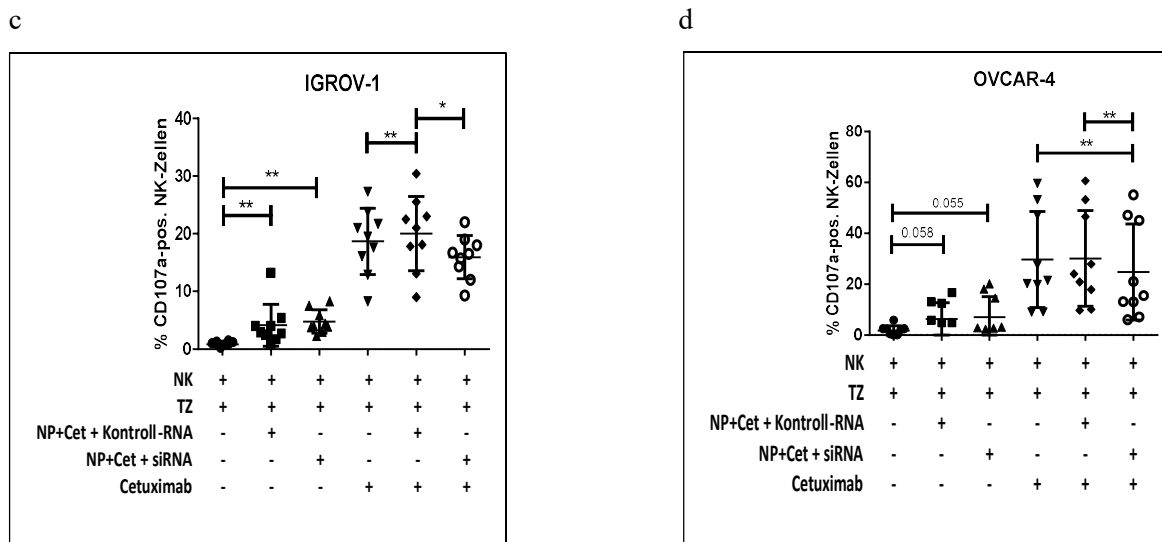
Wie Abb. 21 veranschaulicht, führte die NP-anti-MHC-I-Transfektion sowohl bei OVCAR-4- als auch IGROV-1-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der ADCC. Allerdings konnte auch bei Einsatz der Kontroll-RNA (bei OVCAR-4) bereits eine Zunahme der ADCC beobachtet werden. Im Gegensatz dazu blieb die natürliche Zytotoxizität in Abwesenheit von Cetuximab unbeeinflusst. Bei der getesteten Ovarialkarzinomzellen OVCAR-3 stellten sich die Ergebnisse ähnlich der Zelllinie OVCAR-4 dar.

Die dargestellten Ergebnisse belegen, dass CaP-NP grundsätzlich als Transfektionsreagenz geeignet sind und eine Modulation zytotoxischer NK-Zellfunktionen ermöglichen.

Nachfolgend sollte überprüft werden, inwieweit sich auch Cetuximab-funktionalisierte NP (NP+Cet) zur Transfektion von Ovarialkarzinomzellen und konsekutiver Modulation von NK-Zellen eignen und einen Vorteil gegenüber nicht-funktionalisierten Nanopartikeln bieten.

Dabei war insbesondere von Interesse, ob Cetuximab-funktionalisierte NP zu einer Steigerung der ADCC beitragen können. Der experimentelle Aufbau ist bis auf die Verwendung von NP+Cet analog zu dem vorherigen NP-Transfektionsexperiment und wurde an den vier Zelllinien, IGROV-1, SKOV-3, OVCAR-3 und OVCAR-4 vorgenommen. Nach Transfektion wurde die MHC-I-Rezeptorexpression durchflusszytometrisch überprüft. Die Auswirkungen der transfizierten Tumorzellen auf die NK-Zytotoxizität wurden anschließend wiederum im Rahmen eines Degranulationsassays untersucht. Dazu wurden NK-Zellen mit NP+Cet-anti-MHC-I-transfizierten Tumorzellen bzw. nicht-transfizierten Tumorzellen (Kontrolle) +/- Cetuximab kokubiert und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 22).





**Abb. 22: NK-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen nach Transfektion mit Cetuximab-funktionalisierten NP (NP+Cet).** IGROV-1- (a, c) bzw. OVCAR-4-Tumorzellen (b, d) wurden mit anti-MHC-I-RNA-haltigen NP+Cet transfiziert und mit NK-Zellen (NK) +/- Cetuximab inkubiert. Die Rezeptorexpression von MHC-I wurde nach erfolgter Transfektion überprüft. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität ( $\Delta$ -Median) der drei unabhängig durchgeführten Experimente (a, b). Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Tumorzellen. Nach Durchführung eines Degranulationsassays (c, d) wurden die NK-Zellen hinsichtlich ihrer CD107a-Expression im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der CD107a-positiven NK-Zellen [%] aus 9 unabhängigen Experimenten (n=9). Statistische Signifikanz (\*) nach Wilcoxon-Test angenommen bei  $*p < 0,05$ ;  $**p < 0,0332$

Wie in der Abb. 22 gezeigt, führte die Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit anti-MHC-I-siRNA mittels Cetuximab-funktionalisierten NP (NP+Cet) zu einer überwiegenden Runterregulation des MHC-I-Rezeptors auf den Tumorzellen. Es zeigte sich eine signifikante, wenn auch nur geringe Zunahme der natürlichen Zytotoxizität. Der an die Partikel gebundene Antikörper Cetuximab konnte hier in geringem Umfang ADCC ausüben. Anders stellte sich die Situation im ADCC-Experiment in einer Kokultur aus Tumorzellen, NK-Zellen und Cetuximab dar: Hier verursachten Tumorzellen, die mittels Cetuximab-funktionalisierten NP (NP+Cet) transfiziert worden waren, eine signifikante Abschwächung der vorhandenen ADCC.

Zusammenfassend ergibt die Transfektion mittels Cetuximab-funktionalisierter Nanopartikel keinen Vorteil und führt unter Umständen sogar zu einer Inhibition zytotoxischer NK-Zellfunktion.

Resümierend konnte in diesem ersten Abschnitt der vorliegenden Arbeit dargestellt werden, dass die natürliche Resistenz von Ovarialkarzinomzellen gegenüber zytotoxischer NK-Zellaktivität auf unterschiedliche Weise beeinflusst werden kann. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper (z.B. Cetuximab) einerseits sowie über Modulation der Expression bestimmter Rezeptoren (wie z.B. MHC-I) in den Zielzellen andererseits können NK-Zellen in ihrer zytotoxischen Funktion verstärkt



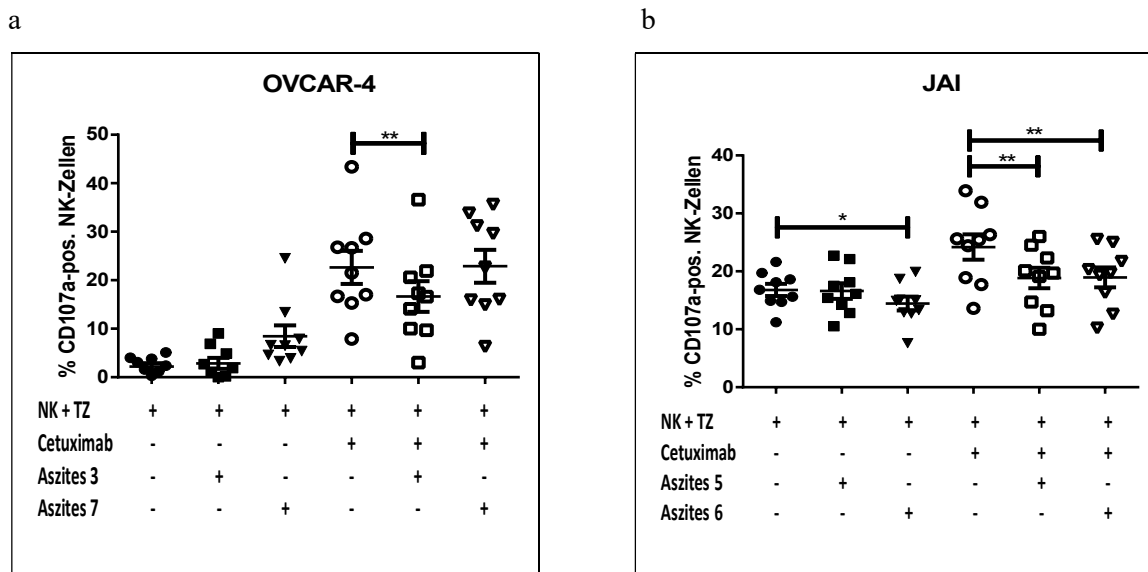
werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Calciumphosphat-NP per se NK-Zell-aktivierende Eigenschaften aufweisen und als Carrier für spezifische Agenzien (z.B. inhibitorische siRNA) in Ovarialkarzinomzellen die Suszeptibilität gegenüber NK-Zell-Zytotoxizität steigern können. Im Gegensatz dazu konnte eine weiterführende Funktionalisierung der Partikel mittels kovalenter Bindung von Cetuximab an die Partikeloberfläche weder ein spezifisches targeting ermöglichen noch zu einer Verstärkung zytotoxischer NK-Zellfunktionen beitragen. Angesichts ihrer grundsätzlichen guten Biokompatibilität und niedrigen Toxizität könnten Calciumphosphat-NP nach den Daten der vorliegenden Arbeit als attraktive Komponente auch im Rahmen eines immuntherapeutischen NK-Zell-Modells in vivo in Frage kommen.

### 3.2 Einfluss von malignem Aszites auf die immunologische Aktivität der NK-Zellen

Das Ovarialkarzinom bietet in seinem fortgeschrittenen Stadium durch den klinisch häufig nachweisbaren malignen Aszites ein besonderes, überwiegend immunsuppressives Milieu für die Interaktion von Tumor- und Immunzellen. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, welchen Einfluss Aszites auf die antitumorale Aktivität von NK-Zellen hat und welche Rolle in diesem Zusammenhang die im ersten Projektteil beschriebenen Calciumphosphat-NP einnehmen können. Um die azellulären Komponenten im Aszites zu untersuchen, wurde der Aszites, der bei 9 Ovarialkarzinompatientinnen im Rahmen der Erstoperation gewonnen worden war, hinsichtlich der zellulären Bestandteile depletiert und steril filtriert.

#### 3.2.1 Auswirkung von azellulärem Aszites auf die Zytotoxizität von NK-Zellen

Um die Auswirkungen von Aszites auf die Zytotoxizität von NK-Zellen zu überprüfen, wurden NK-Zellen und Tumorzellen unterschiedlicher Ovarialkarzinomzelllinien mit verschiedenen zellfreien Aszitesproben inkubiert. Ermittelt wurde im Rahmen eines Degranulationsassays der Anteil CD107a-positiver NK-Zellen als Maß für die natürliche Zytotoxizität als auch Antikörper-vermittelte Zytotoxizität (ADCC) in Anwesenheit des anti-EGFR-Antikörpers Cetuximab (Abb.23).



**Abb. 23: Natürliche NK-Zytotoxizität und Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) bei Anwesenheit von Aszites.** NK-Zellen und Tumorzellen (TZ) der Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-4 (a) und JAI (b) wurden mit verschiedenen Proben von zellfreiem Aszites (Nr. 3 und 7 in a), (Nr. 5 und 6 in b) +/- Cetuximab inkubiert. Nach Markierung der NK-Zellen mit anti-CD107a-FITC im Rahmen eines Degranulationsassays durchflusszytometrische Bestimmung der Anteil CD107a-positiver NK-zellen [%]. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 8-9 unabhängigen Experimenten (n= 9). Statistische Signifikanz angenommen nach Wilcoxon-Test bei \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,0332$ .

Wie in Abb. 23 dargestellt, führten drei der vier exemplarisch dargestellten Aszitesproben (Nr. 3, 5 und 6) zu einer signifikanten Inhibition der ADCC von NK-Zellen. Hingegen zeigte Aszites Nr. 7 kaum einen Effekt. Die natürliche Zytotoxizität blieb weitestgehend unbeeinflusst.

### 3.2.2 Analyse der Aszitesflüssigkeit auf Antikörper der Klasse IgG

Die nachfolgenden Experimente sollten dazu dienen, mögliche Ursachen für die inhibitorische Wirkung von zellfreier Aszitesflüssigkeit auf die ADCC von NK-Zellen zu klären. Da die beobachtete Inhibition im Wesentlichen die ADCC von NK-Zellen betraf, während die natürliche Zytotoxizität unbeeinflusst blieb, ergab sich die Hypothese, dass unter Umständen die Antikörpervermittlung durch den Aszites nachhaltig behindert wird. Daher sollte in diesem ersten Ansatz in der vorliegenden Arbeit überprüft werden, ob eventuell Antikörper in relevantem Ausmaß in der Aszitesflüssigkeit vorhanden sind, die im Sinne einer kompetitiven Hemmung die Wirkung von Cetuximab behindern könnten. Da es sich bei Cetuximab um den Antikörpertyp IgG1 handelt, wurde ein ELISA hinsichtlich der Existenz von IgG1 Antikörpern im Aszites durchgeführt (Abb. 24).

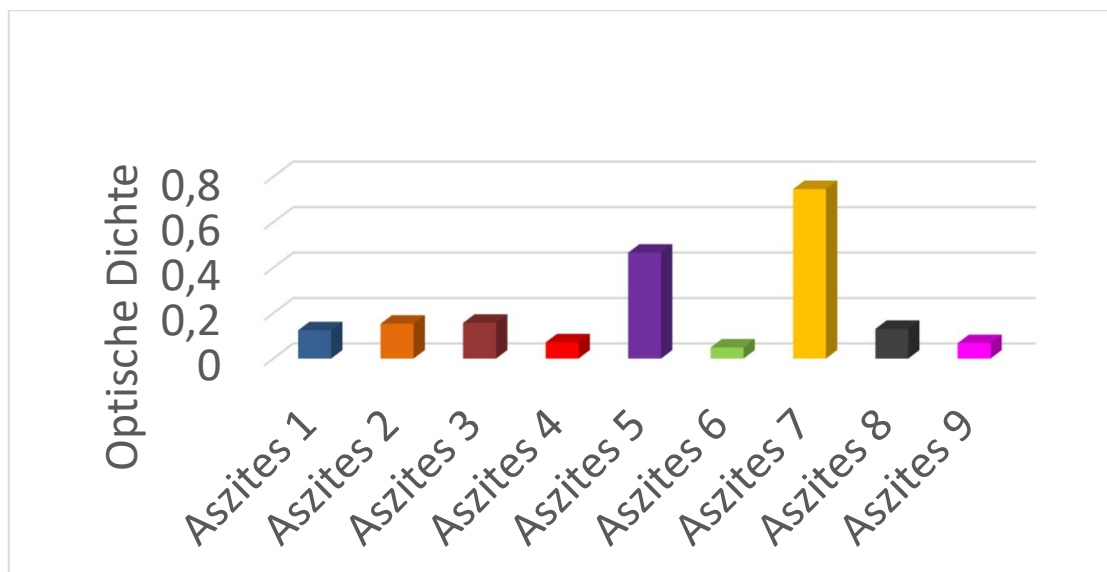


Abb. 24: **Semiquantitative IgG1-Bestimmung per ELISA aus verschiedenen Aszitesproben.** Auf der Ordinate ist die optische Dichte aufgetragen, wobei die Abszisse die verschiedenen Aszitesproben zeigt.

Die Ergebnisse des ELISAs (Abb. 24) zeigten, dass jeder Aszites IgG1-positiv ist. Ebenso ließ sich erkennen, dass die verschiedenen Aszitesproben unterschiedliche Mengen an IgG1 Antikörpern aufwiesen. Aszites Nr. 6 zeigte eine vergleichsweise geringe Menge an IgG1-Antikörpern, während Aszites Nr. 7 die größte Menge an IgG1 Antikörpern aufwies. Allerdings korrelierten die quantitativen IgG1-Mengen nicht mit dem Ausmaß der beobachteten ADCC-Inhibition: Während Aszites Nr. 6 zu einer deutlichen Inhibition führte, wirkte sich Aszites Nr. 7 nur schwach auf die ADCC aus. Aszites Nr. 5 wiederum führte zu einer signifikanten ADCC-Hemmung, wies aber andererseits auch einen vergleichsweise hohen Gehalt an IgG1 auf.

Der nachfolgende experimentellen Ansatz sollte weiterführend klären, welche Rolle IgG1-Antikörper im Aszites bei der antikörper-vermittelten Zytotoxizität von NK-Zellen einnehmen.

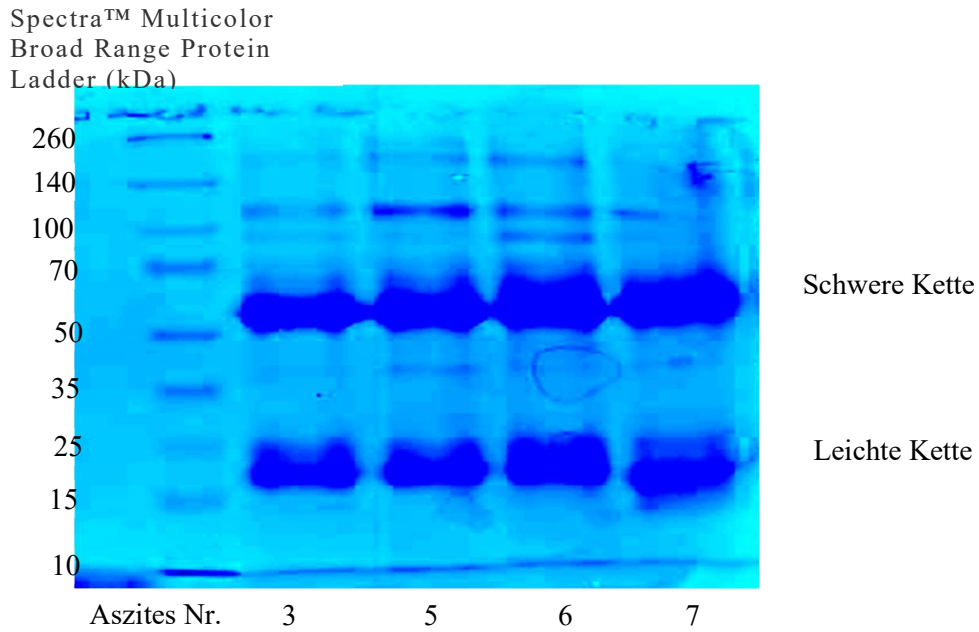
### 3.2.2.1 Depletion und Eluierung von IgG-Antikörpern aus verschiedenen Aszitesproben

Nach der semiquantitativen Bestimmung von IgG in mehreren Aszitesproben sollten im nachfolgenden Versuchsansatz IgG-Antikörper aus verschiedenen Aszitesproben depletiert und eluiert werden. Danach sollte untersucht werden, wie sich die eluierte Antikörperfraktion auf die NK-Zell-Funktion auswirkt.

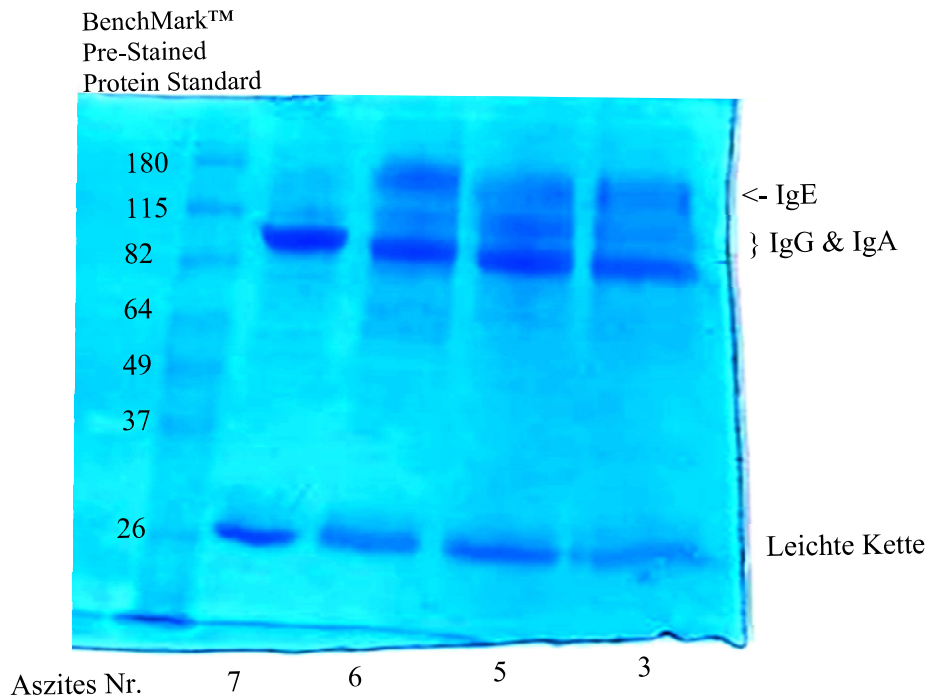
Die Antikörperdepletion erfolgte mit Hilfe einer Chromatographiesäule, die durch gebundene Antigene in der Säule eine Isolation der gesuchten Antikörper ermöglicht. Die Säule war für die Depletion von IgG, IgA, IgE und IgM ausgelegt. Um zu überprüfen, ob IgG-Antikörper in der Elutionsfraktion vorhanden sind, wurde ein Gel mit anschließender Coomassie-Färbung angefertigt

(Abb. 25). Bei der Anfertigung des ersten Gels (Abb. 25a) wurden die Proben denaturiert, beim zweiten Gel (Abb. 25b) wurden nicht-denaturierte Proben verwendet.

a



b



**Abb. 25: SDS-Gel mit denaturierten (a) und nicht denaturierten (b) Antikörpern aus den Aszitesproben.**

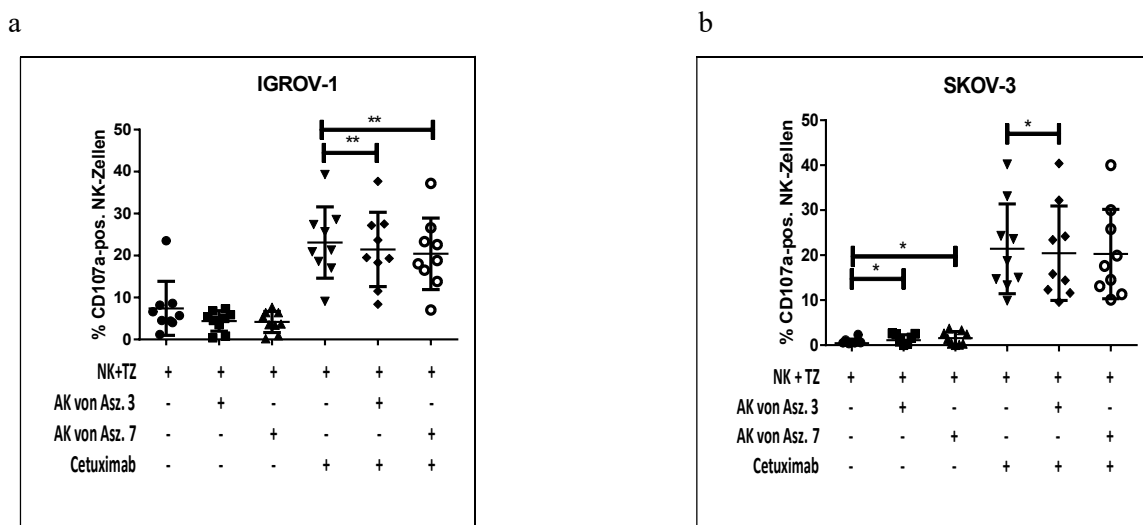
Aszitesproben Nr. 3, 5, 6 und 7 wurden bezüglich ihres IgG-Gehaltes in einem 10%-igen Polyacrylamidgel

elektrophoretisch aufgetrennt. Die Positionen des Markerproteins (a: Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, b: BenchMark™ Pre-stained Protein Ladder) sind nach Molekülmasse in kDa angegeben.

Wie in Abb. 25 a dargestellt, ließen sich sehr starke Banden bei ca. 60kDa erkennen und ebenso eine breite Bande bei ca. 20kDa. Diese Banden konnten am ehesten den schweren und leichten Ketten von Antikörpern zugeordnet werden und wiesen darauf hin, dass die Disulfidbrücken bei der Denaturierung auseinandergebrochen sind. Ebenso ließ sich eine Bande bei ca. 190kDa erkennen, welche möglicherweise IgE-Antikörpern zuzuordnen war. Zudem zeigten sich noch zwei schwache Banden um die 100kDa, die als zwei schwere Ketten interpretiert wurden. Dieses Experiment wurde mit nicht-denaturierten Proben wiederholt (Abb. 25b). Da sich Antikörper grundsätzlich im Bereich zwischen 145-190kDa befinden, war bei dem beobachteten Bandenmuster davon auszugehen, dass sich im Bereich der Banden die eluierten Antikörper befanden. Da IgM mit ~960kDa außerhalb des dargestellten Bereiches liegt, konnte dieser Antikörper nicht im Gel auftreten. IgG (~150 kDa) und IgA (~160 kDa) lagen sehr nah beieinander, wodurch es zu einer Überlagerung der Banden kam. Die Bande von IgE (~190 kDa) konnte durch den größeren Abstand zu den anderen Immunglobulinen gut abgegrenzt werden. Die zusätzliche Bande bei 26kDa war am ehesten einer Leichtkettenbande zuzuordnen.

### 3.2.2.2 Auswirkung der eluierten Antikörper auf die NK-Zytotoxizität

Um zu überprüfen, ob IgG-Antikörper im Aszites bei der Inhibition der ADCC von NK-Zellen eine Rolle spielten, wurde ein Degranulationsassay in Anwesenheit der zuvor eluierten Antikörper aus dem Aszites an vier unterschiedlichen Ovarialkarzinomzelllinien durchgeführt. Nachfolgend ist die NK-Zytotoxizität bei zwei Ovarialkarzinomzelllinien in Anwesenheit eluierter Antikörper von zwei Aszitesproben (Nr. 3 und 7) dargestellt (Abb. 26).



**Abb. 26: Natürliche und Antikörper-vermittelte NK-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen in Anwesenheit von eluierten Antikörpern aus den Aszitesproben.** NK- und Tumorzellen (TZ) der Ovarialkarzinomzelllinien IGROV-1 (a) bzw. SKOV-3 (b) wurden in Anwesenheit von eluierten Antikörpern (AK) der Aszitesproben (Asz.) Nr. 3 bzw. 7 +/- Cetuximab für 1h inkubiert und nach Markierung mit anti-CD107a-FITC durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen [%] als Maß für natürliche Zytotoxizität bzw. ADCC. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 9 unabhängigen Experimenten (n=9). Statistische Signifikanz (\*) nach Wilcoxon-Test \*:  $p = <0,05$ ; \*\*:  $p = <0,0332$ .

Wie in Abb. 26 dargestellt, führte die Hinzugabe eluierter Antikörper von Aszites Nr. 3 wie auch Nr. 7 sowohl bei IGROV (a) als auch SKOV (b) zu einer geringen, wenn auch signifikanten Verringerung der ADCC. Bei der natürlichen Zytotoxizität zeigte sich bei SKOV-3 eine geringe, wenn auch signifikante Verstärkung bei Einsatz der Antikörper.

Bei OVCAR-3 zeigten die AK von Aszites 7 eine signifikante Verringerung der Zytotoxizität, wohingegen die AK von Aszites Nr. 3 nur einen minimalen Einfluss nahmen. OVCAR-4 präsentierte nahezu dieselben Ergebnisse wie OVCAR-3 (OVCAR-3 und OVCAR-4 nicht graphisch dargestellt). Diese Resultate lassen die Schlussfolgerung zu, dass Antikörper zumindest partiell für die beobachtete Inhibition der Antikörper-abhängiger NK-Zytotoxizität verantwortlich sind. Allerdings ist eine Korrelation zwischen Aszitesprobe und Ausmaß der Inhibition nicht möglich, da die Inhibition je nach verwendeter Zelllinie unterschiedlich stark ausfiel. Dennoch ist davon auszugehen, dass IgG-Antikörper eine Rolle bei der Immunsuppression von Aszites spielen.

### 3.2.3 Modulation der Aszites-vermittelten NK-Zell-Inhibition durch Calciumphosphat-Nanopartikel

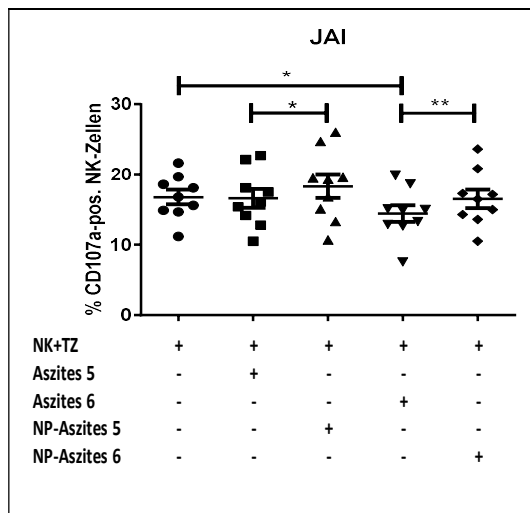
Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Calciumphosphat-Nanopartikel in ihrer Funktion als Carrier durch den Einschluss spezifischer Modulatoren (wie z.B. siRNA) die Interaktion zwischen NK-Zellen und Tumorzellen modulieren können. Darüber hinaus sind CaP-NP aufgrund ihrer biochemischen Struktur in der Lage, unspezifisch Proteine zu binden, was zur Ausbildung einer sog. „Proteincorona“ führt.

Im nachfolgenden experimentellen Ansatz wurde sich diese Eigenschaft von CaP-NP zunutze gemacht. Die Partikel wurden mit der Zielsetzung eingesetzt, durch eine Vorinkubierung mit Aszites Antikörper und mutmaßlich andere relevante Asziteskomponenten unspezifisch an die Partikel zu binden. Im Anschluss sollte überprüft werden, ob sich durch diese Vorbehandlung die inhibitorische Wirkung des Aszites abschwächen und sich die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Ovarialkarzinomzellen wiederherstellen lässt.

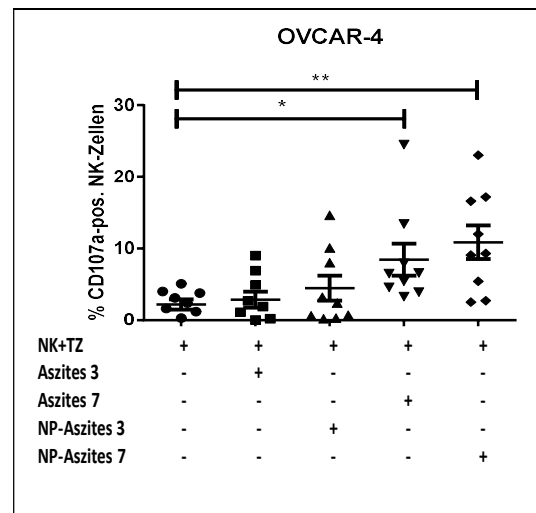
Dazu wurden 4 verschiedene Aszitesproben durch 30-minütige Inkubation mit CaP-NP vorbehandelt und anschließend mit NK-Zellen sowie Tumorzellen von fünf verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien (SKOV-3, JAI, IGROV-1, OVCAR-3 und OVCAR-4) +/- Cetuximab koinkubiert.

Wie Abb. 27 veranschaulicht, führte eine Vorbehandlung der Aszitesproben mit CaP-NP bei allen getesteten Ovarialkarzinomzelllinien zu einer signifikanten Wiederherstellung der Antikörperabhängiger NK-Zytotoxizität. Dabei wurde bei allen Aszitesproben eine deutliche, signifikante Verbesserung der ADCC-Funktion beobachtet. Diese konnte beim Großteil der Zelllinien sogar auf das ursprüngliche Niveau der ADCC angehoben werden. Trotz des nur geringen inhibitorischen Einflusses des Aszites auf die natürliche Zytotoxizität, konnte dennoch auch hier durch Vorbehandlung mit CaP-NP eine signifikante Steigerung der NK-Zell-Degranulation beobachtet werden.

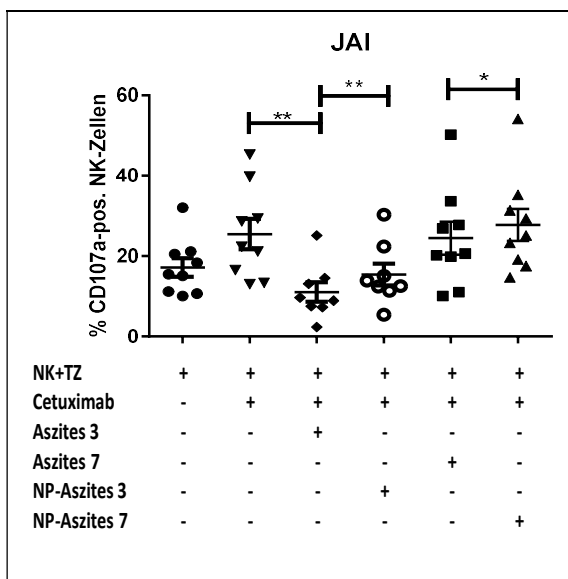
a



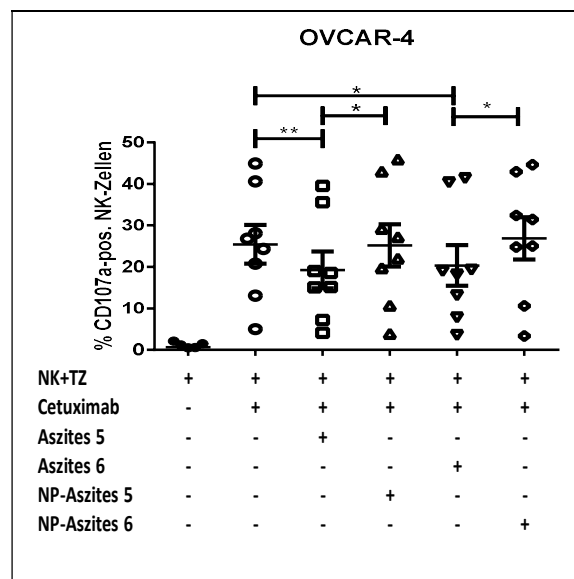
b



c



d



**Abb. 27: Natürliche Zytotoxizität (a+b) und ADCC (c+d) von NK-Zellen gegenüber Ovarialkarzinomzellen in Anwesenheit von NP-vorbehandeltem Aszites.** Die Aszitesproben Nr. 3 und 7 (b+c) bzw. Nr. 5 und 6 (a+d) wurden mit CaP-NP für 30 Minuten vorbehandelt (NP-Aszites). Die NP wurden mittels Zentrifugation aus dem Aszites entfernt. Dieser Aszites-Überstand wurde anschließend mit NK-Zellen (NK) und Tumorzellen (TZ) der Ovarialkarzinomzelllinien OVCAR-4 (b, d) und JAI (a+c) inkubiert (natürliche Zytotoxizität in a+b) bzw. +/- Cetuximab (Cet) inkubiert (ADCC in c+d). Nach Markierung der NK-Zellen mit anti-CD107a-FITC erfolgte die Analyse im Durchflusszytometer. Dargestellt ist der Anteil der CD107a-positiven NK-Zellen [%] als Maß für die NK-Zytotoxizität. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 8-9 unabhängigen Experimenten (n=8-9). Statistische Signifikanz (\*) nach Wilcoxon-Test  $p < 0,05$ . \*:  $p = < 0,05$ ; \*\*:  $p = < 0,0332$ ; \*\*\*:  $p = < 0,0021$  bzw. Mann-Whitney-Test \*:  $p = 0,0159$ ; \*\*:  $p = 0,0079$

Zusammenfassend konnte in diesem zweiten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass zellfreier Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen die Funktionsweise zytotoxischer NK-Zellen nachhaltig supprimiert. Interessanterweise betraf dies im Wesentlichen nur die Antikörpervermittelte NK-Zytotoxizität, wohingegen die natürliche NK-Zytotoxizität weitestgehend unbeeinflusst blieb. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der Inhibition bei den einzelnen Aszitesproben unterschiedlich ausgeprägt war. Weiterführende Analysen ergaben, dass unter Umständen im Aszites vorhandene Antikörper zumindest teilweise bei der NK-Zell-Suppression eine Rolle spielen. Die Experimente mit CaP-NP konnten zeigen, dass diese aufgrund ihrer Fähigkeit zur unspezifischen Bindung von Proteinen mit Bildung einer Proteincorona den supprimierenden Einfluss von Aszites aufheben und eine fast vollständige Restaurierung der ADCC von NK-Zellen bewirken konnten.

Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstreichen somit die auch in vivo beobachtete überwiegend immunsuppressive Wirkung von Aszites, zeigen aber auch auf, dass CaP-NP in der Lage sind, die Suppression zytotoxischer NK-Zellen aufzuheben, was die Effektivität einer angewandten NK-Zell-basierten Immuntherapie steigern könnte.



## 4 DISKUSSION

Die meisten Ovarialkarzinomzellen zeigen natürlicherweise eine ausgeprägte Resistenz gegenüber einer NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität. Für einen NK-Zell-basierten immuntherapeutischen Ansatz ist eine Potenzierung zytotoxischer NK-Zellen somit eine Voraussetzung. Durch den Einsatz monoklonaler Antikörper, wie den anti-EGFR-Antikörper Cetuximab, kann die natürliche Zytotoxizität effektiv gesteigert werden (Antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität, ADCC).

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde dargestellt, über welche weiteren Mechanismen NK-Zellen hinsichtlich ihrer zytotoxischen Funktion gegenüber Ovarialkarzinomzellen verstärkt werden können. Es konnte herausgearbeitet werden, dass die Inhibition bestimmter Zielstrukturen (MHC-I) auf den Tumorzellen bzw. deren Veränderung der Expression (MIC A) im begrenzten Umfang dazu beitragen können, NK-Zytotoxizität zu verstärken. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass biokompatible Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NP) grundsätzlich in ihrer Funktion als Transfektionsreagenz geeignet sind, antitumorale NK-Zellfunktionen zu modulieren. Eine weitere Funktionalisierung mittels Cetuximab führte allerdings nicht zu einem spezifischen Targeting oder einer besseren Aufnahme in die Tumorzelle.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Aspekt berücksichtigt, dass sich Ovarialkarzinome im fortgeschrittenen Stadium intraperitoneal per continuitatem ausbreiten und durch die Bildung von Aszites ein besonderes Milieu für die Interaktion von Tumorzellen und Immunzellen schaffen. Es konnte dargestellt werden, dass zytotoxische NK-Zell-Funktionen signifikant durch zellfreie Aszitesflüssigkeit inhibiert werden. Als möglicher zugrunde liegender Mechanismus wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Aszites vorhandene Antikörper identifiziert, die zu einem Teil die Aszites-vermittelte Hemmung von NK-Zell-Funktionen erklären können.

### 4.1 Möglichkeiten der NK-Zell Modulation

Im Rahmen von Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe ist gezeigt worden, dass Ovarialkarzinomzellen weitgehend eine natürliche Resistenz gegenüber antitumoralen NK-Zell-Funktionen aufweisen. Diese konnte effektiv durch den monoklonalen anti-EGFR-Antikörper Cetuximab über Vermittlung einer Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC) überwunden werden (Gottschalk et al., 2012).

Allerdings konnte dieses Phänomen nicht bei allen Antikörpern der EGFR-Klasse beschrieben werden. Die Ursache dafür liegt mit großer Wahrscheinlichkeit in der unterschiedlichen Affinität der IgG-Antikörper mit Fc-Rezeptoren zu interagieren. Cetuximab gehört zu der Klasse IgG1, welche eine hohe Affinität zum FcIII-Rezeptor der NK-Zelle aufweist, was zu einer Auslösung der ADCC führt (Vidarsson et al., 2014). Der anti-EGFR-Antikörper Necitumumab (zugelassen zur Therapie

des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC)) gehört ebenfalls zur Klasse der IgG1-Antikörper. Bei diesem konnte prinzipiell eine Auslösung einer ADCC bei NSCLCs beobachtet werden (Díaz-Serrano et al., 2019), was ebenfalls für Cetuximab beschrieben werden konnte. Der dritte zugelassene anti-EGFR-Antikörper Panitumumab wird wie Cetuximab auch zur Therapie des kolorektalen-Karzinoms eingesetzt. Panitumumab gehört jedoch zu Klasse der IgG2-Antikörper und hat daher die geringste Affinität zum FcIII-Rezeptor (Vidarsson et al., 2014). Für diesen Antikörper konnte keine Vermittlung der ADCC bei NK-Zellen festgestellt werden, sondern lediglich eine IgG1-ähnliche Reaktion zur Rekrutierung von Neutrophilen und Monozyten (Schneider-Merck et al., 2010). Da EGFR in > 70% aller Ovarialkarzinome exprimiert ist und Cetuximab, wie dargestellt, ein suffizienter Vermittler der ADCC ist, wurde Cetuximab im Rahmen der in vitro-Versuche für die vorliegende Arbeit verwendet.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass jenseits des Einsatzes monoklonaler Antikörper zur ADCC-Induktion über eine Modulation der Oberflächenproteine (MIC A, MHC-I) eine Beeinflussung zytotoxischer NK-Zell-Funktionen in begrenztem Umfang möglich ist.

**MIC A** gehört zur Gruppe der NKG2D-Liganden und bindet spezifisch an den NKG2D-Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der NK-Zellen befindet. Nach Bindung des Liganden wird ein stimulierendes Signal an die NK-Zelle weitergeleitet, was zur NK-Zellaktivierung führt (Bianconi et al., 2001; Steinle et al., 2001). Der NKG2D-Rezeptor, welcher MIC A erkennt, gehört zu den nicht ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) -assoziierten Rezeptoren. Weitere Liganden für NKG2D stellen neben MIC A auch ULBP (UL-binding-protein) dar. Trotz erfolgter Hochregulation von MIC A auf der Tumorzelloberfläche konnte in unseren Daten keine Verstärkung der ADCC nachgewiesen werden. Dies ist konkordant zu publizierten Daten, denen zufolge die Interaktion zwischen MIC A und NK-Zellen bei der ADCC eine untergeordnete bis keine Rolle zu spielen scheint (Moreno et al., 2007). Allerdings zeigte sich in unseren Experimenten eine tendenzielle Verstärkung der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen. Es gibt Anhaltspunkte in der Literatur, dass der NKG2D-Ligand nach Aktivierung des NKG2D-Rezeptors nur Mechanismen der natürlichen Zytotoxizität auslöst (Koch et al., 2013).

Eine alternative Erklärung könnte sein, dass lösliches MIC A die Aktivität des NKG2D-Rezeptors negativ beeinflusst, wodurch dieser nicht mehr aktiviert werden kann (Groh et al., 2002). In diesem Fall wäre eine verringerte zytotoxische Antwort der NK-Zellen die Folge. Dieses Phänomen konnte nicht nur bei NK-Zellen, sondern generell bei PBMC's (Peripheral Blood Mononuclear Cell: Lymphozyten und Monozyten) beobachtet werden (Kwak-Kim and Gilman-Sachs, 2008). Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass dieser Mechanismus bereits bei gastrointestinalen Tumoren (Magenkarzinom, Kolon- und Rektumkarzinom) in vivo nachgewiesen werden konnte. Durch weitere Studien konnte belegt werden, dass sowohl Ovarialkarzinomzellen und auch andere gynäkologische Karzinome eine vermehrte MIC A-Sekretion aufweisen (Holdenrieder et al., 2006a). Zusammenfassend stellt die Sekretion von löslichem MIC A durch Tumorzellen somit einen

immune-escape-Mechanismus dar. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass gesunde Spender eine signifikant niedrigere Konzentration an löslichem MIC A im Serum aufwiesen als Spender mit einer Tumorerkrankung (Holdenrieder et al., 2006b; Salih et al., 2002). Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und der publizierten Daten ist davon auszugehen, dass MIC A bei Vermittlung von NK-Zytotoxizität wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielt. Über MIC A und den NKG2D-Rezeptor ist gegebenenfalls eine Modulation der natürlichen NK-Zytotoxizität zu erreichen, bei Vermittlung der ADCC dagegen scheint dieses Liganden-Rezeptor-System keine Rolle zu spielen.

Der **MHC-I Rezeptor** gilt im Allgemeinen als entscheidender Rezeptor, über den die NK-Zell-Aktivität moduliert wird. Dabei steht vor allem die „missing-self“-Hypothese im Vordergrund, nach der eine Abnahme der MHC-I Expression auf der Zielzelle zur Aktivierung der natürlichen NK-Zell-Zytotoxizität führt. Erklärt wird dies durch das Fehlen der inhibierenden Impulse des MHC-I Rezeptors auf die NK-Zellen (Ferencik et al., 2006; Murphy and Weaver, 2018). Durch Bindung von MHC-I an den MHC-I Rezeptor wird die Aktivierung der NK-Zelle und somit eine Zielzelleliminierung verhindert (Lanier, 1998, 2008; Murphy and Weaver, 2018). Eine Erhöhung der MHC-I Expression auf Tumorzellen kann so zur Steigerung des Wachstum sowie zu einer Verringerung der NK-Sensitivität gegenüber den Karzinomzellen führen (Ljunggren and Kärre, 1990), was einen relevanten immune-escape Mechanismus darstellt. Einige Tumorzellen setzen allerdings auch bewusst einen Verlust von MHC-I Molekülen ein, um dem adaptiven Immunsystem zu entgehen (Garcia-Lora et al., 2003; Garrido et al., 1993). Trotz vorhandener NK-Zellen gelingt es den Tumorzellen weiter zu wachsen und auch zu metastasieren (Garcia-Lora et al., 2003). Dieses Phänomen kann durch MHC-I unabhängige Mechanismen erklärt werden, die die Tumorzellen vor NK-Zelleliminierung schützen. Wie bedeutend die MHC-I-Rezeptordichte auf Tumorzellen ist, zeigt sich daran, dass ein Verlust von MHC-I-Rezeptoren auf Mammakarzinomzellen mit einer verbesserten Prognose zu korrelieren war (Madjd et al., 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Zunahme der natürlichen Zytotoxizität bei allen getesteten Zelllinien nach Einsatz blockierender anti-MHC-I-Antikörper. Im Einklang mit publizierten Daten (Kaufman et al., 1993) belegen somit auch unsere Daten, dass über die Modulation des MHC-I-Rezeptors mittels Antikörpern die natürliche Zytotoxizität von NK-Zellen zu steigern ist. Im Gegensatz dazu zeigte sich überwiegend bei Experimenten, in denen MHC-I mittels siRNA runterreguliert wurde, keine Beeinflussung der natürlichen Zytotoxizität. Dies ist sicher dadurch zu erklären, dass bei den meisten Zelllinien eine Runterregulation von MHC-I nur unzureichend gelang. Lediglich bei dem Verhältnis 0,5:1 von Lipofectamin zu siRNA konnte nur bei der Zelllinie OVCAR-3 eine signifikante Zunahme der natürlichen Zytotoxizität beobachtet werden. Studien belegen jedoch, dass über eine Runterregulation von MHC-I mittels Transfektion grundsätzlich eine Verstärkung der natürlichen NK-Zytotoxizität zu erreichen ist (Bottley et al., 2008).

Bezüglich einer Beeinflussung der ADCC über eine Modulation der MHC-I Rezeptorexpression stellten sich unsere Daten heterogen dar: Bei einem Teil der Zelllinien war tendenziell eine Verstärkung der ADCC durch den Einsatz inhibitorischer MHC-I Antikörper zu beobachten, die jedoch statistisch nicht signifikant war. Auch nach Runterregulation von MHC-I mittels siRNA war tendenziell eine Verstärkung der ADCC zu beobachten, die jedoch bei nahezu allen Zelllinien (Ausnahme: JAI) nicht signifikant war. In der Literatur gibt es allerdings nur wenige Daten und Erklärungsansätze bezüglich des Zusammenhangs zwischen der MHC-I Expression und der ADCC. Eine ältere Studie konnte eine Steigerung der ADCC durch Blockierung von MHC-I zeigen. Dabei korrelierte das Ausmaß der ADCC mit der Rezeptordichte von MHC I (Komatsu and Tamiya, 1998). Zum weiteren Verständnis der möglichen Zusammenhänge der ADCC und der natürlichen Zytotoxizität kann die Signalweiterleitung innerhalb der NK-Zelle möglicherweise einen Erklärungsansatz bieten. Die intrazelluläre Signalkaskade der ADCC über CD16 und des NKG2D-Rezeptors zeigen bei genauer Betrachtung einige Überschneidungen. Beide Wege führen über die Phosphatidylinositol 3-Kinase, welche Phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphat produziert, zu einer Aktivierung der Akt-Kinase und der extracellulär-signal Regulated Kinases (ERK). Der zweite Signalweg führt über eine GRB2 Rekrutierung zu einer Aktivierung der Phospholipase 2. Letztendlich führt sowohl die Aktivierung von CD16, als auch MIC A über den NKG2D-Rezeptor zu einer intrazellulären Calciumerhöhung (Vivier et al., 2004). Infolgedessen stellt sich die Frage, inwieweit die gleichzeitige Aktivierung der verschiedenen Rezeptoren sich gegenseitig beeinflussen. Diese Thematik ist bis heute noch nicht abschließend erforscht. Des Weiteren stellen verschiedene Entwicklungsstufen der NK-Zellen eine beachtenswerte Variable hinsichtlich der Signaltransduktion dar. Hierbei weisen die NK-Zellen eine unterschiedliche Rezeptorzusammensetzung auf, wodurch die Aktivierung und intrazelluläre Signalweiterleitung maßgeblich bestimmt wird (Le Garff-Tavernier et al., 2010). Neben der NK-Zelle selbst spielt auch ihre Interaktion zur Umgebung eine Rolle für das resultierende Signal. Ein sogenannter „immune-crosstalk“ führt durch Interaktion mit anderen Zellen, wie Dendritischen-Zellen, Makrophagen oder T-Zellen, zu einer verstärkten Zytokinausschüttung der NK-Zelle (Malhotra and Shanker, 2011). Bei gleichzeitiger Aktivierung von inhibierenden und stimulierenden Rezeptoren scheint im Verlauf vor allem die De-/Phosphorylierung ein wichtiger Bestandteil in der Signaltransduktion darzustellen. Auch die Anzahl der an die Rezeptor bindenden Liganden soll einen Einfluss auf die Stärke des intrazellulären Signals haben (Vivier et al., 2004).

MHC-I und NKG2D sind nicht die einzigen Rezeptoren über die die NK-Zellfunktion entscheidend beeinflusst werden. Rezeptoren mit ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif) -gekoppelten Proteinen gehören zu den am stärksten aktivierenden Rezeptorgruppen. Dazu gehört auch CD16 (FcγRIIIA), welcher als Bindungsstelle für Antikörper zur Vermittlung der ADCC unmittelbar zuständig ist (Bryceson et al., 2011). Dabei korreliert die Rezeptordichte von CD16 mit dem Ausmaß der ADCC (Romee et al., 2013). Bei der Aktivierung von CD16 wird unter anderem

die Metalloproteinase ADAM17 aktiviert, welche zu einem Abbau von CD16 führt und somit die ADCC negativ reguliert. Eine Inhibition von ADAM17 dagegen führte zu einer verstärkten Zytokinproduktion, vor allem von INF- $\gamma$ , was wiederum zu einer Aktivierung weiterer NK-Zellen und zur Rekrutierung von Makrophagen und T-Zellen führt (Bryceson et al., 2011).

Zusammenfassend zeigte sich in Bezug auf die Regulation von MHC-I eine mögliche Verstärkung der NK-Degranulation auf, sowohl in Bezug auf die natürliche Zytotoxizität als auch die der ADCC. Daher stellt dies ein zusätzlicher Behandlungsansatz der Ovarialkarzinomtherapie dar, auch um die schon bestehenden Therapieformen zu unterstützen. Ein wichtiger Aspekt, der hierbei noch Berücksichtigung erfahren muss ist die selektive Anwendung der MHC-I Runterregulation. Denn eine Problematik bei der Anwendung in vivo stellen die anderen körpereigenen gesunden Zellen dar. Würden diese mithilfe von Antikörpern gegen die MHC-I Rezeptoren auch blockieren, wäre dies eine unerwünschte Nebenwirkung der Therapie. Zur Tumortherapie in vivo sollte die zielgerichtete Modulation der Karzinomzellen berücksichtigt und umgesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit der NK-Modulation könnte durch eine Regulation von CD16 erfolgen. Durch Hemmung von ADAM17 oder selektiver Hochregulation von CD16 könnte eine Verstärkung der ADCC sowie eine vermehrte Rekrutierung anderer Immunzellen erzielt werden. Gegebenenfalls könnte eine Kombination einer MHC-I Modulation mit Beeinflussung der CD16 Expression zu einer Addition der positiven Effekte führen. Daher ist es von großer Bedeutung, die Möglichkeiten der zielgerichteten Therapie noch weiter zu erforschen und zu verbessern.

#### 4.2 Auswirkung von malignem Aszites auf die NK-Zell-Aktivität

Im fortgeschrittenen Stadium gehen Ovarialkarzinome als Folge einer intraperitonealer Tumoraussaat häufig mit der Bildung von malignem Aszites einher. Dadurch entsteht ein besonderes Milieu aus einer Vielzahl biologisch aktiver Substanzen, was letztlich die Interaktion von Tumorzellen mit Immunzellen immunsuppressiv beeinflusst und Tumorwachstum und -proliferation fördert (Matte et al., 2012). Durch die entstehende spezielle Umgebung können sich auch Einschränkungen und Herausforderungen hinsichtlich therapeutischer Optionen ergeben (Freedman et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zellfreier Aszites, der im Rahmen der Primäroperation von Patientinnen mit Ovarialkarzinom gewonnen worden war, die Interaktion von NK-Zellen und Tumorzellen nachhaltig beeinflussen konnte. Maligner Aszites stellt eine heterogene Flüssigkeit bestehend aus einer Vielzahl von immunaktiven Substanzen dar. So sind mehrere Studien publiziert, die die Existenz zahlreicher Zytokine in der Aszitesflüssigkeit beschreiben (Baade, 2006; Kampan et al., 2017; Schwörer, 2016).

Die Konzentration von IL-6 war von den Zytokinen am höchsten, anschließend folgte IL-8 und anschließend IL-10. Hohe Konzentration von IL-6, als auch hohe Konzentrationen von IL-10 im

Aszites gehen mit einer schlechteren Prognose beim Ovarialkarzinom einher (Lane et al., 2011). IL-6 gehört wie auch IL-6R und IL-10 zu den proinflammatorischen Zytokinen und führen eine Verstärkung des immunsuppressiven Milieus in der Tumorumgebung. IL-8 zählt zu den proangiogenen Zytokinen und führt zur verstärkten Angiogenese was letztlich eine entscheidende Rolle beim Tumorwachstum darstellt. Bei IL-10 konnte auch eine immunsuppressive Komponente während des Tumorwachstums beschrieben werden, wodurch sich ein möglicher Immunescape-Mechanismus der Tumorzellen erklären lässt (Matte et al., 2012). Ein weiterer immunsuppressiver Faktor, der im Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen identifiziert werden konnte, ist TGF- $\beta$ 1. Bei Frauen mit benignem Ovarialtumor konnte TGF- $\beta$ 1 nicht detektiert werden, wohingegen bei Vorliegen eines Ovarialkarzinoms ein deutlicher Anstieg der TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Aszites zu verzeichnen war (Nowak et al., 2010). Bei Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium zeigte sich zudem eine höhere Konzentration von TNF- $\beta$ 1 als bei Patientinnen im Anfangsstadium. Ebenfalls konnte ein Zusammenhang zwischen dem FIGO-Stadium und dem Erfolg einer zytoreduktiven Operation in Bezug auf die TGF- $\beta$ 1 Konzentration im Serum der Patientinnen erfasst werden (Nowak et al., 2010). Obwohl INF- $\gamma$  immunaktivierend ist und in vielen antitumoralen Therapien eingesetzt wird, war bei Patientinnen mit einer erhöhten Konzentration von INF- $\gamma$  im Aszites ein fortgeschrittenes Tumorstadium sowie ein suboptimales Operationsergebnis assoziiert. Dadurch zeigte sich in dieser Gruppe ebenfalls eine verkürzte Überlebenszeit. INF- $\gamma$  kann daher als möglicher prognostischer Marker für eine Immuntherapie herangezogen werden (Chen et al., 2013). Insgesamt stellt sich maligner Aszites als ein deutlich immunsuppressives Milieu dar und enthält zahlreiche verschiedene Zytokine, die auch als möglicher prognostischer Prädiktor der Karzinomerkkrankung dienen können (Schwörer, 2016).

Dabei können die identifizierten Zytokine im Aszites mit verschiedenen Immunzellen interagieren und diese gegebenenfalls beeinflussen. IL-6 wurde bereits in Ovarialkarzinomstudien als proinflammatorisches Zytokin im Aszites identifiziert, wodurch suppressive regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>-Zellen) vermehrt vorkommen. Dies bewirkt eine vermehrte Expression eines immunsuppressiven Moleküls, wodurch die Tumorzellelimination eingeschränkt wird (Kampan et al., 2017). Darüber hinaus war der Nachweis von erhöhtem IL6 und IL10 im Aszites im Vergleich zum Serum korreliert mit einem proportionalen Anstieg der Zytokin-sezernierenden NK-Zellen (CD56<sup>bri</sup>) und einer Abnahme zytotoxisch aktiver NK-Zellen (CD56<sup>dim</sup>) (Tonetti et al., 2021). Im Vergleich zum Serum gesunder Probanden wiesen die Seren von Ovarialkarzinompatientinnen eine signifikant geringere NK-Zell-Anzahl auf, während diese im Aszites signifikant erhöht war (Yunusova et al., 2018). Diese waren zwar vermehrt degranuliert (CD107-positiv) jedoch war der Anteil der zytotoxisch aktiven NK-Zellen (Perforin und Granzym B-positiv) reduziert (Yunusova et al., 2018).

Im Einklang mit den publizierten Studien konnten wir für unser Aszites-Kollektiv ebenfalls einen überwiegend immunsuppressiven Effekt nachweisen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt

werden, dass maligner, zellfreier Aszites vorwiegend immunsuppressiv auf die ADCC wirkt. Dies ließ sich bei drei von vier Aszitesproben signifikant nachweisen. Die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen blieb weitestgehend unbeeinflusst. Allerdings gibt es nur vereinzelt Arbeiten (Fu, 1989), die die Auswirkung von malignem Aszites auf NK-Zell-Funktionen untersucht haben. Hier konnten inhibierende Eigenschaften von Aszites auf die NK-Zellaktivität beschrieben werden. Die Verringerung der Aktivität wurde hierbei nicht durch eine abnehmende Anzahl der NK-Zellen verursacht. Dort wurde die Hypothese formuliert, dass die inhibierenden Faktoren aktiv durch die Tumorzellen sezerniert wurden. Andere Studien belegen eine Inhibition von T-Zellen durch vorliegenden malignen Aszites. Dies wird durch nicht-spezifisierbare Faktoren hervorgerufen, die gegebenenfalls selbst von aktivierten T-Zellen produziert wurden. Darunter wurde ebenfalls die Vermutung eines negativen Feedback-Mechanismus aufgestellt, der auf eine verminderte Aktivierung der T-Zellen untereinander hinweist (Oh and Moolten, 1981). Eine andere Studie konnte diverse Faktoren detektieren, die im Aszites von Ovarialkarzinomen vorhanden sind und eine Verringerung der Lymphozytenproliferation, sowie der Lymphozytenaktivierung bedingen (Elg et al., 1997). Eine Inhibition von natürlichen-Killer-T-Zellen (NKT) wurde ebenfalls bei Ovarialkarzinom-assoziiertem malignem Aszites beobachtet. Die Inhibition war diesen Daten zufolge auf eine verminderte Zytokinproduktion zurückzuführen (Webb et al., 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass vor allem die NK-zellvermittelte ADCC in Anwesenheit von zellfreiem malignem Aszites inhibiert war. Im Einklang mit unseren Daten konnten Studien zeigen, dass NK-Zellen von Ovarialkarzinompatientinnen in Anwesenheit von malignem Aszites und Ovarialkarzinomzellen eine verringerte Degranulationsfähigkeit aufwiesen. Es konnte gezeigt werden, dass dabei die Expression von DNAM-1 als auch CD16 auf der NK-Zelloberfläche reduziert war (da Silva et al., 2017). Die verminderte Expression von CD16 war dabei möglicherweise auf IL-18 sowie TGF $\beta$  zurückzuführen. Als weitere Faktoren für eine reduzierte NK-Zytotoxizität im Aszites kann der Nachweis von Makrophagen-Migration-Inhibitor-Faktor (MIF) herangezogen werden, welcher die NKG2D-Expression der NK-Zellen möglicherweise beeinflussen kann (Greppi et al., 2019). Dabei korreliert ein erhöhtes Vorkommen von MIF als auch dem sNKG2D-Liganden im malignen Aszites mit einem früheren Rückfall der Tumorerkrankung und mit einer schlechteren Prognose (Vyas et al., 2017).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit von Aszitesflüssigkeit zu einer signifikanten Inhibition der ADCC, jedoch nicht der natürlichen Zytotoxizität führt. Daher wurde nachfolgend die Hypothese entwickelt und überprüft, ob im Aszites Antikörper vorhanden sind, die durch Interaktion mit Cetuximab den ADCC-Mechanismus behindern und abschwächen. Es konnte gezeigt werden, dass sich unterschiedliche Mengen der IgG-Antikörper in den jeweiligen Aszites-Proben befanden. Dieses Ergebnis wurde in diversen Studien bestätigt, in denen aus murinen Aszites IgG Antikörper isoliert werden konnten (Anderson et al., 1986; Perussia et al., 1984; Stanker et al., 1985). Auch in Ovarialkarzinompatientinnen konnten bereits IgG- und IgM-Antikörper im

malignen Aszites in relevanter Konzentration nachgewiesen werden (Björge et al., 2005). Die semiquantitativen Mengen der nachgewiesenen IgG-Antikörper korrelierten in unseren Experimenten allerdings nicht direkt mit der Stärke des inhibierenden Einflusses. Durch nachfolgende Experimente mit eluierten IgG-Antikörpern konnte in der vorliegenden Arbeit belegt werden, dass die Inhibition der ADCC zumindest teilweise auf vorhandene IgG-Antikörper zurückgeführt werden kann. Dies erklärt auch unsere Beobachtung, dass die natürliche NK-Zell-Zytotoxizität durch Aszites unbeeinflusst blieb.

Als möglicher Mechanismus bei Inhibition der ADCC durch vorhandene Antikörper kommt eine kompetitive Hemmung des Fc-Rezeptors auf den NK-Zellen in Frage. Der Fc-Rezeptor auf der NK-Zelloberfläche gilt als aktivierender Rezeptor, vor allem bei Vermittlung der ADCC nach Bindung des spezifischen Antikörpers über dessen Fc-Fragment. Jedoch ist der Fc-Rezeptor ebenfalls in der Lage, inhibitorische Signale zu generieren. Dabei erweist sich vor allem ein wenig affiner Rezeptor für IgG (FcγRII) als wichtiger Bestandteil des inhibitorischen Signalweges (Tuijnman et al., 1992). Ebenfalls möglich wäre eine Aktivierung des inhibitorischen Signalweges durch die im Aszites vorhandenen Anteile von IgG. Auch eine Blockierung des aktivierenden Rezeptors für die ADCC, wodurch eine verringerte NK-Zell Aktivität resultieren würde, wäre denkbar. Zu dieser Überlegung konnte eine Studie durch Modulation dieser beiden Rezeptoren bestätigende Ergebnisse erzielen. Dabei sollte die inflammatorische Wirkung bestimmter Zellen verringert werden, um zu starke entzündliche Reaktionen zu vermeiden (Samuelsson et al., 2001). Um diese Reaktion zu verhindern, könnte sowohl eine Hochregulation des beschriebenen inhibitorischen FcγRII Signalweges als auch durch eine Runterregulation des aktivierenden Signalweges von FcγRγ erfolgen (Clynes et al., 1999). Die Datenlage über inhibierende Antikörper, welche aus Aszites gewonnen werden können und die Funktion von Immunzellen, insbesondere NK-Zellen, ist deutlich eingeschränkt. Eine neuere Studie konnte den Nachweis von Immunglobulinen, vor allem von IgG und IgA, bei Leberzirrhose und Leberzellkarzinom im vorhandenen Aszites erbringen (Nakamura et al., 2020). Einen Einfluss auf Immunzellen wurde dabei aber nicht untersucht. Daher ist es im weiteren Verlauf wichtig, dieser Frage im Detail nachzugehen. Dazu sollten zuerst mehrere verschiedene Konzentrationen der Antikörper getestet werden, um eine mögliche Dosisabhängigkeit feststellen zu können. Darüber hinaus ist eine Separierung der verschiedenen Antikörper (IgG, IgA, IgE) anzustreben, um den Einfluss der einzelnen Immunglobuline auf die NK-Zell Aktivität zu testen. Abschließend sollte evaluiert werden, an welche Strukturen der NK-Zelle die Antikörper binden und die möglichen Zielstrukturen auf den Tumorzellen.

Da die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Inhibition der ADCC nur partiell durch im Aszites vorhandene Antikörper zu erklären war, ist zu vermuten, dass weitere Mechanismen bei der Immunsuppression eine Rolle spielen. Beispielsweise ist neben Zytokinen für den Tumormarker CA 125 bzw. MUC-16 belegt, dass dieser die NK-Zellaktivität beeinflussen kann. MUC-16 wird durch vorhandenen malignen Aszites vermehrt aus den mesothelialen Zellen im Peritoneum



sezerniert (Matte et al., 2019). MUC-16 beeinflusst die zytotoxischen Effekte von NK-Zellen, indem es durch Bindung an diese zu einer Runterregulation von CD16 und zur Verminderung einer zytotoxischen Antwort führt. Dies wird laut einer Studie durch einen Shift der NK-Subpopulation mit vermehrten Auftreten von CD16<sup>-</sup> CD56<sup>br</sup> NK-Zellen in der peritonealen Flüssigkeit bedingt (Belisle et al., 2007). Die vermehrte Sekretion von MUC-16 bei Tumoren wird daher auch als Escape-Mechanismus mit dem Ziel der Metastasierung und des Tumorwachstums diskutiert. Ein weiterer Mechanismus von Ovarialkarzinomzellen stellt die Sekretion von CD95-Liganden (FAS Liganden) dar. Diese werden in Mikrovesikeln in die Aszitesflüssigkeit abgegeben und auf der Tumorzelloberfläche exprimiert. CD95-Liganden führen bei CD95- exprimierenden Immunzellen zur Induktion der Apoptose (Kipps et al., 2013). Ein weiterer Mechanismus der Tumorzellen sich dem Immunsystem zu entziehen, besteht in der Expression von membrangebundenem Komplement (C)-Regulatoren und Inhibitoren sowie deren Sekretion in die Tumorumgebung. Trotz vorhandenem Komplement-System schützen sich so die Tumorzellen vor einer Komplementaktivierung (Björge et al., 2005).

Es ist anzunehmen, dass darüber hinaus weitere Faktoren und Mechanismen existieren, die letztlich zu einer Immunsuppression von malignem Aszites führen. Direkt an die Experimente der vorliegenden Arbeit anknüpfend wären weiterführende Experimente an der genauen Aufschlüsselung der Antikörper sinnvoll. Darunter sollte die genaue Bindung der aus dem Aszites stammenden Antikörper an die Immunzellen durch z.B. Immunfluoreszenz untersucht werden. Ein weiterer Schritt wäre die Untersuchung anderer Proteine, vor allem von Albumin, da dieses Protein in der Regel in höchster Konzentration im malignen Aszites nachzuweisen ist. Bislang sind noch nicht alle Komponenten des malignen Aszites hinsichtlich ihrer Fähigkeit, Immunzellen zu beeinflussen, erforscht. Ein tiefergehendes Verständnis über die immunmodulatorische Fähigkeit von malignem Aszites zu erlangen, ist jedoch von hoher klinischer Relevanz. Denn erst die Kenntnis der wesentlichen immunmodulatorischen Zusammenhänge im Aszites und deren mögliche Beeinflussung ermöglicht die erfolgreiche Etablierung einer intraperitonealen Immuntherapie beim Ovarialkarzinom im klinischen Alltag.

## 4.3 Einsatz von Calciumphosphat-Nanopartikel als therapeutisches Tool

### 4.3.1 Calciumphosphat-Nanopartikel als Transfektionsreagenz

In den letzten Jahren wurden die Forschung im Bereich der Nanopartikel zunehmend intensiviert, wodurch vielfältige Einsätze im industriellen aber auch im medizinischen Bereich ermöglicht wurden. Im Bereich der Nanomedizin werden Nanopartikel als diagnostisches Mittel, aber auch vielversprechend therapeutisch bei verschiedenen Erkrankungen, so auch bei malignen Erkrankungen eingesetzt. Gold-Nanopartikel beispielsweise können als effektives intrazelluläres

Therapeutikum eingesetzt werden. Durch Bindung von Amin-, Phosphin- und Thiol-Gruppen ist es ebenfalls möglich Gold-Nanopartikel mit Antikörpern oder Proteinen zu funktionalisieren (Giljohann et al., 2010; Louis and Pluchery, 2012). Auch Silber-Nanopartikel stellen ein Tool zur antiviralen und antiinflammatorischen Therapie sowie zur Knocheninduktion dar (Murphy et al., 2015).

Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NP) bieten für den klinischen Einsatz potenziell eine Vielzahl an Anwendungsmöglichkeiten, da sie aufgrund ihrer Zusammensetzung eine hohe Biokompatibilität und geringe Toxizität sowie den Vorteil der Funktionalisierbarkeit aufweisen (Chu et al., 2002; Fu et al., 2005; Wang et al., 2014). Für die klinische Anwendung sind sie bislang allerdings noch nicht ausreichend evaluiert. Insbesondere für den Einsatz funktionalisierter CaP-NP liegen nur sehr begrenzt Daten vor. Ebenso ist bislang unbekannt, wie CaP-NP bei einer möglichen immuntherapeutischen Anwendung die Interaktion zwischen Tumor- und NK-Zellen beeinflussen können. Daher wurden in der vorliegenden Arbeit CaP-NP hinsichtlich ihres Einsatzes als Transfektionsreagenz zur Rezeptormodulation von Zielzellen evaluiert. Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit CaP-NP die antitumorale Aktivität von NK-Zellen beeinflussen können. Beide Aspekte stellen eine Voraussetzung für eine potenzielle Integration von CaP-NP in zukünftige immuntherapeutische Konzepte dar.

Zunächst wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme von CaP-NP in Ovarialkarzinomzellen untersucht. Dazu wurden fluoreszenzmarkierte Partikel verwendet. Des Weiteren kamen funktionalisierte CaP-NP mit gekoppeltem Cetuximab zum Einsatz, um eine spezifische Aufnahme über Bindung an den EGF-Rezeptor zu untersuchen (Targeting). Überraschenderweise lag die Aufnahmefrequenz der unfunktionalisierten NP bei 56-57 %, wobei die Aufnahme der an Cetuximab gekoppelten Partikel lediglich ca. 30 % betrug. Somit wurden unfunktionalisierte CaP-NP relativ gut in die Zelle aufgenommen, während die Bindung an Cetuximab eine Aufnahme in die Zellen offensichtlich hemmte. In der Literatur findet man diesbezüglich größtenteils keine detaillierten Angaben zur quantitativen Aufnahme. Oftmals wird lediglich eine effektive Aufnahme in Tumorzelllinien beschrieben (Sokolova and Epple, 2021; Sokolova et al., 2012). Eine einzelne Arbeit beschäftigte sich dennoch genau mit dieser Frage und analysierte zehn verschiedene Zelllinien hinsichtlich der prozentualen Aufnahme von mehrschaligen, DNA-beladenen CaP-NP. Es wurden sowohl CaP-NP mit und ohne Silicahülle evaluiert. Als Kontrolle wurde hierbei, wie in der vorliegenden Arbeit, ebenfalls das Transfektionsreagenz Lipofectamin verwendet. Es zeigte sich bei zwei von zehn Zelllinien kein effektiver Uptake, weder bei Verwendung von Lipofectamin noch bei den CaP-NP. Bei den verbliebenen acht Zelllinien zeigte sich bei sechs Zelllinien eine deutlich effizientere Transfektion mit Lipofectamin als durch die NP. Durch die NP mit Silicahülle konnte eine Transfektionseffizienz zwischen ca. 7% bis maximal ca. 48% erreichen. Die NP ohne Silicahülle zeigten eine Transfektionseffizienz zwischen minimal 5% und maximal 70% (Neuhaus et al., 2016). Unsere Daten gliedern sich somit in die vorhandene Literatur ein. Eine Funktionalisierung der

Partikel mit dem anti-EGFR-Antikörper Cetuximab führte allerdings in den fluoreszenzmikroskopischen Analysen der vorliegenden Arbeit nicht zu einer Steigerung der Aufnahme in die EGFR-positiven Ovarialkarzinomzellen. Der Vorteil funktionalisierter Partikel liegt in einem potenziellen Targeting, d.h. in der spezifischen Aufnahme in die Tumorzellen verbunden mit spezifischen Effekten durch die Partikel, die mittels modulierende RNA oder DNA funktionalisiert sind. Grundsätzlich ist eine Funktionalisierung von CaP-NP mittels spezifischer Antikörper über deren Bindung an eine zusätzliche Silicahülle technisch problemlos möglich. In der Vergangenheit gelang es des Weiteren, CaP-NP mittels RNA oder DNA zu funktionalisieren und eine Aufnahme in die Zielzellen zu erreichen (Kozlova et al., 2012). Im Gegensatz zu den eigenen Daten konnte in einigen Fällen bereits nachgewiesen werden, dass durch Bindung spezifischer Antikörper die Aufnahme von NP in die Zellen gesteigert werden kann. Dabei scheint eine Steigerung der Menge an gebundenen Antikörpern mit einer erhöhten Aufnahme in die Tumorzellen zu korrelieren (Tsai et al., 2009). In Anbetracht dieser Daten könnte ggf. eine zukünftige Erhöhung der Cetuximab-Konzentration in unserem Ansatz die Transfektionseffizienz der funktionalisierten Partikel optimieren. Weitere Beispiele für ein erfolgreiches Targeting konnten mittels gebundenem anti-CD11-Antikörper an CaP-NP erzielt werden. Diese wurden mit CD11-positiven dendritischen Zellen inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Zellen deutlich mehr anti-CD11-beladenen NP auf ihrer Oberfläche präsentierten als an Kontroll-NP (Kozlova et al., 2012). Eine weitere Studie belegt ebenfalls die grundsätzliche Spezifität funktionalisierter Partikel. Hierbei wurden naive B-Zellen über ein Hen Egg Lysozyme Antigen (HEL), welches an CaP-NP gekoppelt wurde, spezifisch detektiert und aktiviert. CaP-NP mit einem Kontrollantigen lösten keine Aktivierung der B-Zellen aus (Temchura et al., 2014). Neben der Konzentration der spezifischen Antikörper hängt der Erfolg funktionalisierter Partikel u.U. auch von biochemischen und physikalischen Eigenschaften der Partikel selbst ab. Grundlegend ist bekannt, dass CaP-NP in Abhängigkeit von ihrer Größe über verschiedene Mechanismen aufgenommen werden. Dabei werden Nanopartikel mit einer Größe  $<200$  nm vor allem durch Endozytose aufgenommen (Sokolova and Epple, 2021). Dabei spielt nicht nur die Größe, sondern auch die Konzentration der Partikel eine wesentliche Rolle. Des Weiteren erfolgt eine Aufnahme der Partikel in die Zelle auch in Abhängigkeit der Inkubationszeit: Größere Nanopartikel mit 80 nm wurden nach längerer Zeit als 16 nm-große Partikel aufgenommen (Kumar et al., 2017). Für CaP-NP konnte ebenfalls eine konzentrationsabhängige Aufnahme beschrieben werden. Die Aufnahme der ca. 120 nm großen Partikel in HeLa-Zellen erfolgte hierbei vorwiegend durch Mikropinozytose (Sokolova et al., 2013). Infolgedessen besteht die Möglichkeit, dass in unseren Experimenten für die deutlich größeren, mit Silicahülle versehenen Nanopartikel mit einer Inkubationszeit von 3h ein zu kurzer Beobachtungszeitraum gewählt worden war. Neben einer spezifischen Aufnahme von Nanopartikel existieren allerdings auch Studien über eine ungerichtete, nicht-spezifische Internalisierung von Nanopartikeln. Darunter konnte bereits eine ungerichtete Aufnahme von PEGylierten-Nanopartikeln

in Makrophagen beschrieben werden. In diesem Zusammenhang zeigte sich vor allem eine größenabhängige Aufnahme der Partikel als entscheidender Faktor. Eine Größe von 30-100 nm erwies sich hier als besonders effektiv. Allerdings zeigten die kleineren Partikel (30nm), im Vergleich zu den größeren Partikeln (100nm), eine geringere Aufnahmeeffizienz (Shann et al., 2012). Dieser Größenbereich umfasst auch die in der Arbeit verwendeten Calciumphosphat-Nanopartikel.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich dreischalige CaP-NP als Transfektionsreagenz eignen. Die Überlegenheit von dreischaligen CaP-NP gegenüber einschaligen CaP-NP konnte bereits beschrieben werden. Dabei wurden verschiedenen Tumorzellen (HeLa, LTK, T-HUVEC) zuerst mittels einschaligen CaP-NP mit EGFP (enhanced green fluorescent protein) transfiziert. Als Kontrolle wurde die Transfektion mit Polyfect-DNA durchgeführt. Hierbei verlief die Transfektionsrate eher gering aus. Bei Verwendung von dreischaligen CaP-NP, wie sie auch in unseren Experimenten verwendet wurden, konnte die Transfektionseffizienz deutlich gesteigert und auf dasselbe Niveau wie die Kontrolle mit Polyfect angehoben werden. Dies ist durch die stabilisierende Wirkung des Mehrschalen-Modells auf die DNA zu erklären, wodurch ein vorzeitiger Abbau der DNA durch Nukleasen verhindert wird (Sokolova et al., 2006).

Bei Inkubation der CaP-NP mit verschiedenen Ovarialkarzinomzelllinien zeigte sich, dass diese die Nanopartikel in unterschiedlichem Maße aufnahmen. IGROV-1 stellte sich im Verlauf der Versuche als resistent gegenüber Transfektionen dar, wohingegen die OVCAR-Linien eine erfolgreiche Transfektion aufwiesen. Studien über die Inkubation von Gold-Nanopartikeln bei Ovarialkarzinomzelllinien kamen zu vergleichbaren Ergebnissen. Bei den Linien OVCAR-8 und SKOV-3 zeigte sich eine generell höhere Aufnahme der Gold-Nanopartikel im Vergleich zu OVCAR-5. Daraus wurde geschlossen, dass die Zelllinien eine unterschiedliche Affinität zur Aufnahme von Nanopartikeln zeigen (Kumar, 2018). Dieses Phänomen konnte in Zusammenhang mit CaP-NP auch bei HeLa-Zellen und MG63-Zellen beobachtet werden. In diesem Versuchsaufbau zeigten HeLa-Zellen eine deutlich höhere Aufnahme von CaP-NP als die MG63-Zellkultur (Sokolova et al., 2019). Ursächlich könnte dafür die Unterscheidung der Genomsequenzen sowie unterschiedlich ausgeprägte Mutationen sein. Beispielsweise zeigt die Linie IGROV-1 im Vergleich zu natürlichen Ovarialkarzinomzellen eine deutliche Hypermutation mit vermehrter Rezeptorexpression. Ebenso zeigt SKOV-3 eine eher geringere Übereinstimmung mit high-grade serösen Ovarialkarzinomzellen. OVCAR-4 hat hingegen eine sehr hohe genetische Übereinstimmung mit high-grade serösen Ovarialkarzinomzellen (Domcke et al., 2013).

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse der Experimente und der Literatur sind CaP-NP grundsätzlich für die Transfektion von Ovarialkarzinomzellen geeignet, da eine ausreichende intrazelluläre Aufnahme stattfindet. Dennoch bleibt die Frage zu klären, wie die Aufnahme von CaP-NP, insbesondere der funktionalisierten CaP-NP, noch optimiert werden kann. In zukünftigen Ansätzen müssten die oben beschriebenen Aspekte wie Antikörperkonzentration, CaP-NP-

Konzentration, Größe der Partikel sowie Inkubationszeit hinsichtlich einer Steigerung der Transfektionseffizienz evaluiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde CaP-NP mittels inhibitorischer anti-MHC-I-RNA funktionalisiert, um die Expression von MHC-I in den Tumorzellen zu modulieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bei dem Einsatz von MHC-I funktionalisierten CaP-NP waren mit denen des Lipofectamins vergleichbar. Ähnliche Ergebnisse konnten andere Arbeitsgruppen mit Polyethylenglycol-stabilisierten CaP-NP erzielen, die mit inhibitorischer anti-Bcl-2-siRNA funktionalisiert worden waren. Hier zeigte sich durch eine Erhöhung der siRNA-Konzentration ein gleichwertiges Ergebnis zu Lipofectamin. Allerdings zeigte sich auch bei Verwendung von CaP-NP mit mismatch-RNA ebenfalls eine signifikante, relative Bcl-2 Inhibition. Die Aufnahme der CaP-NP erfolgte hier vor allem Clathrin-abhängig und wurden intrazellulär im Endosom verarbeitet (Giger et al., 2013). Auch siRNA, kodierend für die Luziferase-Aktivität, zeigte in Kombination mit Lipidbedeckten-CaP-NP eine effektive Inhibition der Luziferaseaktivität. Hierbei konnte durch Funktionalisierung der Polyethylenglykol-Hülle mit einem Sigma-1-Rezeptor-Ligand eine noch stärkere Runterregulation der Luziferaseaktivität erreicht werden (Li et al., 2010). Zusammenfassend konnten Calciumphosphat-Nanopartikel somit in einigen in in-vitro Studien gute Erfolge als Transfektionsreagenz verzeichnen (Epple et al., 2010; Hu et al., 2012). Vergleicht man die Ergebnisse der Transfektion mit CaP-NP mit der von Lipofectamin, zeigt sich eine ähnliche Effektivität. Durch Erhöhung der Lipofectaminkonzentration konnte die Transfektionseffizienz noch verbessert werden, welche dann auch gegenüber der NP überlegen war. Im Anschluss daran müsste man die Konzentration der transfizierenden NP ebenfalls erhöhen, um gegebenenfalls einen ähnlichen Effekt zu erzielen. Denn wie bereits beschrieben ist die Aufnahme von NP dosisabhängig und erhöht sich somit bei steigender Konzentration (Sokolova et al., 2013). Trotzdem muss kritisch angemerkt werden, dass in der vorliegenden Arbeit die MHC-I-Expression nur partiell runterzuregulieren war. Allerdings scheint dies eher an Spezifitäten der jeweiligen Zelllinien zu liegen, da die MHC-I-Expression bei beiden Transfektionsreagenzien (Lipofectamin und CaP-NP) vergleichbar war.

Neben dem Einschluss von inhibitorischer siRNA bieten CaP-NP eine Vielzahl weiterer Anwendungsmöglichkeiten als intrazellulären Transporter (Sokolova and Epple, 2008). Durch die gute Funktionalisierbarkeit sind CaP-NP auch für den geschützten Transport von DNA in die Zelle geeignet. Diese Möglichkeiten der Transfektion mit einer geringen Zytotoxizität für die Zellen stellt einen neuen Weg der nicht-viralen Transfektion dar (Epple et al., 2010; Hu et al., 2012). Weitere Anwendungsbereiche ergeben sich beispielsweise aus der Funktionalisierung mit einem TLR9 Ligand (CpG) kombiniert mit einem Antigen für Influenza A. Diese funktionalisierten CaP-NP konnten erfolgreich zur Induktion einer Immunzellantwort sowie zur möglichen Vakzinierung eingesetzt werden (Knuschke et al., 2013). Ein weiterer Bereich stellt die Aktivierung von Immunzellen, z.B. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, dar. Dieser folgt eine quantitative und effizientere Steigerung der

Immunantwort (Scheffel et al., 2020). Ebenfalls Anwendung finden CaP-NP im Bereich der Stammzellstimulation. Hier konnte durch Silica-CaP-NP mittels Beladung von Strontium und einer Hülle aus Calciumphosphat mit Zink eine Stimulation von mesenchymalen Stromazellen erreicht werden. Dies führte zu einer Induktion der Osteogenese durch Stimulation der alkalischen Phosphatase und osteogenetischer Genexpression (Sutthavas et al., 2021). Zudem können CaP-NP als sog. Nanocarrier auch zum Transport von Medikamenten eingesetzt werden. Diese können vor allem im Bereich der tumorspezifischen Therapie als auch im Bereich der Bildgebung vielfältig eingesetzt werden (Epple et al., 2010). Im Bereich der Transfektion zeigten sich auch verschiedene Arten von CaP-NP als suffizient. Sowohl lipidbedeckte NP als auch polyethylenglykolstabilisierte CaP-NP erwiesen sich als ausgezeichnete Transfektionsreagenzien. Entscheidender Faktor scheint dabei der strukturelle Aufbau der Partikel zu sein. Die dreischaligen Modelle, die in dieser Arbeit verwendet wurden, zeigen bisher sehr gute Ergebnisse. In anderen Studien konnte belegt werden, dass ein dreischaliger Aufbau hinsichtlich Effizienz und Stabilität der NP einen Vorteil im Vergleich zu einschaligen Modellen bietet (Lechardeur et al., 2005; Sokolova et al., 2006).

Zusammenfassend stellen CaP-NP einen vielversprechenden Ansatz als Transfektionsreagenz dar. Durch Beladung der CaP-NP mittels verschiedener Substanzen ergeben sich eine Vielzahl an Möglichkeiten der Funktionalisierung. Durch Integration von siRNA in CaP-NP ist es möglich, eine Runterregulation verschiedener Gene in den Zielzellen zu erreichen. Bei zusätzlicher Verwendung einer äußeren Silicahülle ist es möglich, Antikörper oder andere Moleküle an die äußere Schicht der CaP-NP zu koppeln und sie so zusätzlich für einen zielgerichteten Transport (Targeting) zu funktionalisieren. Die diesbezüglichen Resultate der vorliegenden Arbeit belegen sowohl die Funktionalisierbarkeit als auch die grundsätzliche Eignung von CaP-NP als Transfektionsreagenz. In der Gesamtbetrachtung bilden sie die Basis für die weiterführenden, in diesem Abschnitt diskutierten Aspekte sowie für eine weitere Evaluation *in vivo*.

#### 4.3.2 Interaktion von Ca-P-Nanopartikel und NK-Zellen

Vor einem eventuellen Einsatz von Nanopartikeln *in vivo* muss untersucht werden, wie die Partikel mit biologischem Gewebe, vor allem mit Zellen des Immunsystems interagieren. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass CaP-NP aufgrund ihrer biochemischen Struktur eine geringe Toxizität und hohe Biokompatibilität *in vitro* wie *in vivo* aufweisen (Sokolova and Epple, 2021). CaP-NP sind außerdem in der Lage eine inflammatorische Antwort in verschiedenen Zelltypen auszulösen. Dies zeigte sich in verschiedenen Studien durch eine verstärkte Produktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6 als auch TNF- $\alpha$ . Diesbezüglich wurden PMNs (Polymorphonuclear Leukocytes/Granulozyten), PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cell), Monozyten und Makrophagen in unterschiedlichen Studien untersucht. Auch *in vivo*-Modelle

konnten eine inflammatorische Reaktion durch CaP-Partikel nachweisen (Velard et al., 2013). Eine andere Studie konnte zeigen, dass durch Silica-Nanopartikel eine Aktivierung von T-Zellen ausgelöst werden kann. Dabei konnten sowohl auf CD4-T-Helferzellen als auch auf zytotoxische CD8-T-Zellen eine vermehrte Expression aktivierende Oberflächenrezeptoren wie CD25 und CD69 erreicht werden. Es zeigten sich vor allem kleinere Silicapartikel als starke, direkte Aktivatoren der T-Zellen (Vis et al., 2018). Für weitere Nanopartikel aus Gold, Silber oder Zink wurden ebenfalls immunmodulatorische Wirkungen beschrieben. Diese proinflammatorischen Effekte zeigten sich sowohl in vivo als auch in vitro. Ebenfalls konnte bei Verwendung von Kohlenstoffnanoröhrchen eine Aktivierung des Komplementsystem nachgewiesen werden (Kononenko et al., 2015). Über die Interaktion von CaP-NP mit NK-Zellen liegen bislang keine Studien vor. Daher lag ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der Untersuchung des Zusammenspiels von Nanopartikeln und NK-Zellen.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass der alleinige Kontakt zwischen CaP-NP und NK-Zellen ohne anwesende Zielzellen bereits zu einer ungerichteten Aktivierung der NK-Zellen führte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CaP-NP zu einer signifikanten Steigerung der NK-Zell-vermittelten ADCC (in Anwesenheit von Cetuximab) gegenüber Ovarialkarzinomzellen führen. Im Gegensatz dazu führte der Einsatz von Cetuximab-gebundenen Partikeln (CaP-NP-Cet) zu keiner weiteren Aktivierung der NK-Zellen. Daraus ergibt sich die Vermutung, dass die Calciumphosphat-Nanopartikel unter bestimmten Umständen selbst als mögliche Zielstruktur für NK-Zellen fungieren können. Eine mögliche Ursache für die NK-Zell-Aktivierung könnte in einer unspezifischen Rezeptoraktivierung der NK-Zelle durch CaP-NP begründet sein. Dabei scheint die biochemische Struktur und Oberfläche der NP entscheidend zu sein. Dreischalige NP (CaP-PEI-CaP-PEI) zeigten eine verstärkte zytotoxischen NK-Zellaktivität. Eine Studie konnte eine Mastzelldegranulation durch den Einsatz von Silbrenanopartikeln nachweisen. Dabei führt allem Anschein nach die Aktivierung des SR-B1 Rezeptors über Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphate (PIP3) und PLC $\gamma$ 1 (Phosphoinositide phospholipase C) zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration und somit zu einer Degranulation der Mastzelle (Alsaleh et al., 2016). Wie vorher beschrieben, nutzen NK-Zellen ebenfalls den Signalweg über PIP3 zur Degranulation, allerdings besitzen sie nicht den SR-B1-Rezeptor. Dennoch wäre es möglich, dass die in der Arbeit verwendeten CaP-NP NK-Zell-Rezeptoren aktivieren können. Der Einsatz Cetuximab-gekoppelten NP führte allerdings nicht zur Aktivierung der NK-Zellen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass der Antikörper bereits mit seinem Fc-Teil an dem NP gebunden ist. Alternativ kommen sterische Behinderungen der Fc-Bindungsstelle der NK-Zelle als mögliche Ursache in Betracht. Durch die bei den funktionalisierten CaP-NP verwendete Silcahülle wird ebenfalls sowohl PEI als auch der Calciumphosphat-Kern bedeckt, was das Argument unterstützen würde, dass diese Substanzen einen Effekt auf die NK-Zelle ausüben. Einen weiteren Erklärungsansatz stellt die Neigung der NP zur Agglomeration dar. Durch Agglomeration der

Partikel entstehen Aggregate im dreistelligen nm-Bereich, welche aufgrund der Größe als Zielstruktur von NK-Zellen erkannt werden und eine unspezifische Aktivierung der NK-Zelle hervorrufen könnte. Im Falle einer Anwendung im Rahmen einer Immuntherapie müssten die Nanopartikel vor Applikation entsprechend aufbereitet werden, um möglichst eine Separierung der Partikel bei Applikation zu gewährleisten. Dies kann beispielsweise mittels einer kurzfristigen Ultraschallbehandlung erfolgen (Kozlova et al., 2012). Diese Hypothese wurden zwischenzeitlich in der Arbeitsgruppe nach Abschluss der hier beschriebenen Arbeiten weiterverfolgt und untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass nach kurzer Ultraschallpartikel disperse CaP-NP weder zu einer unspezifischen NK-Zellaktivierung führten noch die zytotoxische NK-Zellaktivität beeinflussten (Hrvat et al., 2022). Grundsätzlich bleibt jedoch die Frage zu klären, über welche Mechanismen und Rezeptoren agglomerierte CaP-NP NK-Zellen aktivieren können.

In der Literatur finden sich diesbezüglich nur wenige Studien. Grundsätzlich scheinen CaP-NP in der Lage zu sein, unter bestimmten Umständen eine inflammatorische Immunantwort auszulösen zu können, was für CaP-beschichtete Implantate gezeigt werden konnte (Velard et al., 2013). Neuere Erkenntnisse weisen auf eine Induktion des EGFR targeting chimeric antigen receptor auf NK-Zellen durch Einsatz multifunktionaler NP hin. Dieser Mechanismus soll eine Verstärkung antitumoraler Effekte bewirken (Kim et al., 2019). Ferner konnte eine Verstärkung der inflammatorischen Zytokinproduktion bei Makrophagen durch den Einsatz amorpher Calciumphosphat-Nanopartikel erzielt werden. Darunter zeigten sich keine erhöhte Apoptoserate, was die geringe Toxizität der CaP-NP unterstreicht (Chen et al., 2021).

Weitere Studien die den speziellen Aspekt der Interaktion zwischen CaP-NP und NK-Zellen erörtern sind bislang nicht veröffentlicht. Allerdings stellt dies eine wichtige zu klärende Frage vor einer möglichen Applikation in vivo dar, denn bei Applikation der CaP-NP in den Organismus werden diese zuerst mit den Zellen des angeborenen Immunsystems, zu denen NK-Zellen gerechnet werden, konfrontiert. Erst im weiteren Verlauf werden Komponenten des adaptiven Immunsystems (wie beispielsweise T-Zellen) eine spezifische Immunantwort auf CaP-NP entwickeln. Dabei müssen auch die Konsequenzen einer unspezifischen Aufnahme der NP z.B. durch Makrophagen oder andere körpereigene Zellen für Zellen des Immunsystems berücksichtigt werden. Insbesondere bei Verwendung von funktionalisierten CaP-NP stellt sich die Frage, welche Reaktionen von den verschiedenen zellulären und azellulären Komponenten des Immunsystems zu erwarten sind.

Zusammenfassend konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass CaP-NP in der Lage sind, in Abhängigkeit ihrer physikalischen und biochemischen Eigenschaften NK-Zellen funktionell zu beeinflussen. Dabei scheint eine Bindung spezifischer Antikörper an CaP-NP zu einer Inhibition zu führen, während unfunktionalisierte CaP-NP einer Aktivierung von NK-Zellen verursachen. Im Einklang mit der Literatur, die einen überwiegend stimulierenden Effekt von CaP-NP auf verschiedene Immunzellen belegen konnte, sind unseren Daten zufolge bei entsprechender Präparation der Partikel ebenfalls eine Aktivierung von NK-Zellen zu erwarten. In zukünftigen



Untersuchungen sollten die Mechanismen einer funktionellen NK-Zellen Veränderung, hervorgerufen durch CaP-NP, analysiert werden. Dies bildet die Voraussetzung für die Evaluation des Verhaltens von CaP-NP *in vivo*.

#### 4.3.3 Interaktion von Ca-P-Nanopartikeln in malignem Aszites

Durch die meist späte Diagnose des Ovarialkarzinoms liegt oftmals ein fortgeschrittenes Stadium mit einer stattgefundenen Ausbreitung *per continuitatem* in die Bauchhöhle und daraus resultierenden Peritonealkarzinose vor. Der entstandene maligne Aszites belastet die Patientinnen nicht nur symptomatisch, sondern hat auch Konsequenzen auf die Interaktion von Immunzellen und Tumorzellen. Dabei stellt maligner Aszites ein besonderes Milieu dar, welches neben zellulären auch azelluläre Bestandteilen enthält. Azellulärer Aszites besteht aus verschiedenen immunaktiven Substanzen, die die Interaktion von Tumorzellen mit Immunzellen immunsuppressiv beeinflussen und Tumorwachstum und -proliferation fördern (Matte et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die antitumorale NK-Zellaktivität nachhaltig durch zellfreien Aszites gehemmt wird, was auch die Effektivität eines immuntherapeutischen Ansatzes *in vivo* einschränken würde. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit überprüft, welche Rolle CaP-NP in einem immunsuppressiven Milieu aus Aszites im Hinblick auf die NK-Tumorzell-Interaktion einnehmen können. Unsere Untersuchungen konnten erstmals zeigen, dass eine Inkubation der Nanopartikel zu einer Kokultur aus NK-Zellen und Ovarialkarzinomzellen zu einer fast vollständigen Aufhebung der Immunsuppression und Wiederherstellung der ursprünglichen zytotoxischen NK-Zell-Aktivität führte.

Publizierte Studien zum Verhalten von CaP-NP in malignem Aszites von Ovarialkarzinompatientinnen liegen bislang nicht vor. Es ist aber bekannt, dass CaP-NP die Eigenschaft besitzen, bei Kontakt mit biologischer Flüssigkeit Proteine an ihre Oberfläche zu binden und eine sog. „Protein-Corona“ auszubilden (Yang et al., 2013). Es ist daher zu vermuten, dass CaP-NP aufgrund ihrer Absorptionseigenschaften, Komponenten aus dem Aszites binden, die für die NK-Suppression verantwortlich sind. In unseren Untersuchungen zur Immunsuppression der Aszitesflüssigkeit konnten wir nach Depletion der zellulären Bestandteile unter anderem Antikörper nachweisen, die sich inhibierend auf die zytotoxische NK-Zellaktivität auswirkten. Es ist somit wahrscheinlich, dass auch diese im Rahmen der Ausbildung einer „Protein-Corona“ von CaP-NP absorbiert werden, was zur Wiederherstellung der zytotoxischen NK-Zellfunktion beitragen konnte. Diese Hypothese wird dadurch bestärkt, dass in unseren Experimenten lediglich die ADCC durch Aszites inhibiert war, die natürliche NK-Zytotoxizität in Anwesenheit therapeutischer Antikörper dagegen im Wesentlichen unbeeinflusst blieb. Einschränkend muss allerdings angemerkt werden,

dass das Ausmaß der NK-Inhibition zelllinienabhängig war und nicht mit der IgG-Konzentration in den einzelnen Aszitesproben korrelierte (siehe 4.2).

Zusammenfassend könnte aufgrund der Daten der vorliegenden Arbeit die Integration von CaP-NP in einen immuntherapeutischen Ansatz, insbesondere zur intraperitonealen Therapie von Ovarialkarzinomzellen, bei Vorliegen von Aszites von Vorteil sein.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erstmals zeigen, dass sich CaP-NP aus verschiedenen Gründen als Bestandteil eines immuntherapeutischen Konzeptes potenziell zur Behandlung des Ovarialkarzinoms, insbesondere zur intraperitonealen Therapie eignen: CaP-NP stellten sich auch in der vorliegenden Arbeit grundsätzlich als biokompatibel mit geringer Toxizität dar. Sie können aufgrund ihrer Zusammensetzung aus Calciumphosphat leicht standardisiert hergestellt werden und sind leicht verfügbar. Als Carrier für modulierende Agenzien (wie beispielsweise inhibitorische siRNA) können sie von Ovarialkarzinomzellen aufgenommen werden, was die Möglichkeit eröffnet, Ovarialkarzinomzellen susceptibler gegenüber NK-Zytotoxizität zu gestalten. Bei Inkubation gegenüber NK-Zellen führen CaP-NP zu einer unspezifischen Aktivierung von NK-Zellen. In Anwesenheit therapeutischer Antikörper sind CaP-NP zudem in der Lage, die NK-Zell-vermittelte ADCC gegenüber Tumorzellen zu potenzieren. In einem immunsuppressiven Milieu wie dem malignen Aszites, der regelhaft bei Ovarialkarzinompatientinnen im fortgeschrittenen Krankheitsstadium auftritt, können CaP-NP bei intraperitonealer Applikation sogar zu einer Restauration von Immunzell-Funktionen beitragen. Weiterführende Untersuchungen sollten daher vor allem die Auswirkungen von CaP-NP auf weitere Immunzellen analysieren und offene Fragen wie den spezifischen Transport von CaP-NP (Targeting) sowie weitere Möglichkeiten der Funktionalisierung zur Modulation von Ovarialkarzinomzellen adressieren, um eine Evaluation der Partikel in vivo vorzubereiten.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ovarialkarzinom wird oft erst in fortgeschrittenen Stadien diagnostiziert und weist, unter anderem durch die intraperitoneale Lage und daraus resultierendem malignem Aszites, eine ungünstige Prognose auf (5-JÜR FIGO III: 35 %). Aufgrund dieser besonderen inflammatorischen Tumorumgebung und der eingeschränkten Effektivität etablierter Therapien erscheint die Entwicklung immuntherapeutischer Strategien beim Ovarialkarzinom vielversprechend. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* System aus Ovarialkarzinomzellen und Natürlichen Killer-Zellen (NK) sowie verschiedenen modifizierenden Komponenten wie Antikörper und inhibierende Ribonukleinsäure (RNA) etabliert, welche die antitumorale NK-Zell-Aktivität gegenüber Ovarialkarzinomzellen modulieren und potenzieren sollten. Zusätzlich wurden biokompatible Calciumphosphat-Nanopartikel (CaP-NP) eingesetzt und hinsichtlich ihrer Eignung als Transfektionsreagenz und funktionalisierte Carrier sowie hinsichtlich ihrer Wirkung auf die NK-Tumorzell-Interaktion evaluiert. Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen wurden auch Auswirkungen von azellulärer Aszitesflüssigkeit auf die antitumorale NK-Zellaktivität im Rahmen des oben beschriebenen *in vitro*-Systems untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass über die Modulation des Haupthistokompatibilitätskomplex-I (MHC-I) die zytotoxische NK-Zell-Aktivität gegenüber Ovarialkarzinomzellen partiell moduliert werden kann. Funktionalisierte CaP-NP können dabei als Transfektionsreagenz dienen, da sie eine geringe Toxizität und eine adäquate Aufnahme in Ovarialkarzinomzellen aufwiesen. Ferner konnte demonstriert werden, dass CaP-NP zu einer unspezifischen NK-Zellaktivierung führen und in der Lage sind, Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC), wie sie beispielsweise durch den therapeutischen anti-epidermal-growth-factor-receptor (EGFR)-Antikörper Cetuximab vermittelt wird, zu potenzieren. CaP-NP, die durch Bindung von Cetuximab funktionalisiert worden sind, waren allerdings nicht in der Lage, einen gerichteten Transport der Partikel (Targeting) zu gewährleisten und führten zur Abschwächung der NK-Zell-vermittelten ADCC. In einer Umgebung aus azellulärem Aszites war die zytotoxische, Antikörper-abhängige NK-Zellaktivität signifikant inhibiert. Diese konnte durch den Einsatz der CaP-NP größtenteils wiederhergestellt werden, was u.U. den absorbierenden Eigenschaften von CaP-NP zuzuschreiben ist. Weitere Analysen zu potenziellen NK-Zell-Inhibitoren im Aszites identifizierten vorhandene Immunglobulin G (IgG)-Antikörper, die für die Hemmung antitumoraler NK-Zell-Funktionen im Aszites zumindest partiell verantwortlich sein könnten. Die vorliegende Arbeit konnte somit ein *in vitro*-System vorstellen, welches verschiedene Möglichkeiten der NK-Zell-Modulation beim Ovarialkarzinom aufzeigt. Insbesondere CaP-NP erwiesen sich dabei als attraktive, biokompatible Komponente, die zur Überwindung des immunsuppressiven Tumormikromilieus beim Ovarialkarzinom im Rahmen eines intraperitonealen immuntherapeutischen NK-Zell-basierten Ansatzes beitragen könnte.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Alsaleh, N.B., Persaud, I., and Brown, J.M. (2016). Silver nanoparticle-directed mast cell degranulation is mediated through calcium and PI3K signaling independent of the high affinity IgE receptor. *PloS one* *11*, e0167366.
2. Anderson, C.L., Guyre, P., Whitin, J., Ryan, D., Looney, R., and Fanger, M. (1986). Monoclonal antibodies to Fc receptors for IgG on human mononuclear phagocytes. Antibody characterization and induction of superoxide production in a monocyte cell line. *Journal of Biological Chemistry* *261*, 12856-12864.
3. Baade, B. (2006). Bedeutung von Zytokinen im Aszites und Serum nach Lebertransplantation bei Kindern.
4. Baselga, J. (2001). The EGFR as a target for anticancer therapy—focus on cetuximab. *European Journal of Cancer* *37*, 16-22.
5. Belisle, J.A., Gubbels, J.A., Raphael, C.A., Migneault, M., Rancourt, C., Connor, J.P., and Patankar, M.S. (2007). Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology* *122*, 418-429.
6. Biassoni, R., Cantoni, C., Pende, D., Sivori, S., Parolini, S., Vitale, M., Bottino, C., and Moretta, A. (2001). Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunological reviews* *181*, 203-214.
7. Bijman, M.N., van Berkel, M.P., Kok, M., Janmaat, M.L., and Boven, E. (2009). Inhibition of functional HER family members increases the sensitivity to docetaxel in human ovarian cancer cell lines. *Anti-cancer drugs* *20*, 450-460.
8. Bjørge, L., Hakulinen, J., Vintermyr, O., Jarva, H., Jensen, T.S., Iversen, O.E., and Meri, S. (2005). Ascitic complement system in ovarian cancer. *British journal of cancer* *92*, 895-905.
9. Böcker, W., Denk, H., Heitz, P.U., Moch, H., Höfler, G., and Kreipe, H. (2012). *Lehrbuch Pathologie* (Elsevier Health Sciences Germany).
10. Bottley, G., Watherston, O., Hiew, Y., Norrild, B., Cook, G., and Blair, G. (2008). High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. *Oncogene* *27*, 1794-1799.
11. Bryceson, Y.T., Chiang, S.C., Darmanin, S., Fauriat, C., Schlums, H., Theorell, J., and Wood, S.M. (2011). Molecular mechanisms of natural killer cell activation. *Journal of innate immunity* *3*, 216-226.
12. Chen, L., Qiao, P., Liu, H., and Shao, L. (2021). Amorphous Calcium Phosphate NPs Mediate the Macrophage Response and Modulate BMSC Osteogenesis. *Inflammation* *44*, 278-296.
13. Chen, Y.L., Cheng, W.F., Chang, M.C., Lin, H.W., Huang, C.T., Chien, C.L., and Chen, C.A. (2013). Interferon-gamma in ascites could be a predictive biomarker of outcome in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* *131*, 63-68.

14. Chu, T.-C., He, Q., and Potter, D.E. (2002). Biodegradable calcium phosphate nanoparticles as a new vehicle for delivery of a potential ocular hypotensive agent. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics* *18*, 507-514.
15. Clynes, R., Maizes, J.S., Guinamard, R., Ono, M., Takai, T., and Ravetch, J.V. (1999). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *Journal of Experimental Medicine* *189*, 179-186.
16. da Silva, R.F., Yoshida, A., Cardozo, D.M., Jales, R.M., Paust, S., Derchain, S., and Guimarães, F. (2017). Natural Killer Cells Response to IL-2 Stimulation Is Distinct between Ascites with the Presence or Absence of Malignant Cells in Ovarian Cancer Patients. *Int J Mol Sci* *18*.
17. Denaro, N., and Merlano, M. (2015). Profile of Afatinib and its Potential in the Treatment of Head and Neck Cancer: Current Evidence. *J Oncol Transl Res* *1*, 2.
18. Díaz-Serrano, A., Sánchez-Torre, A., and Paz-Ares, L. (2019). Necitumumab for the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *Future Oncology* *15*, 705-716.
19. Domcke, S., Sinha, R., Levine, D.A., Sander, C., and Schultz, N. (2013). Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nature communications* *4*, 2126.
20. Du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., and Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: a combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. *Cancer* *115*, 1234-1244.
21. Elg, S.A., Mayer, A.R., Carson, L.F., Twiggs, L.B., Hill, R.B., and Ramakrishnan, S. (1997).  $\alpha$ -1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovarian carcinoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* *80*, 1448-1456.
22. Epple, M., Ganesan, K., Heumann, R., Klesing, J., Kovtun, A., Neumann, S., and Sokolova, V. (2010). Application of calcium phosphate nanoparticles in biomedicine. *Journal of Materials Chemistry* *20*, 18-23.
23. Ferencík, M., Rovensky, J., Matha, V., and Herold, M. (2006). *Kompndium der Immunologie: Grundlagen und Klinik* (Springer-Verlag).
24. Fischer-Colbrie, J., Witt, A., Heinzl, H., Speiser, P., Czerwenka, K., Sevelde, P., and Zeillinger, R. (1997). EGFR and steroid receptors in ovarian carcinoma: comparison with prognostic parameters and outcome of patients. *Anticancer research* *17*, 613-619.
25. Freedman, R.S., Deavers, M., Liu, J., and Wang, E. (2004). Peritoneal inflammation—a microenvironment for epithelial ovarian cancer (EOC). *Journal of Translational Medicine* *2*, 23.
26. Fu, H., Hu, Y., McNelis, T., and Hollinger, J.O. (2005). A calcium phosphate-based gene delivery system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials* *74*, 40-48.
27. Fu, J.Y. (1989). [Studies on the possible causes of decreasing NK cell activity in tumor-bearing mice. II. Serum and peritoneal exudate from ascitic tumor-bearing mice suppress NK cell activity]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* *11*, 446-448.
28. Fujiwara, K., Hasegawa, K., and Nagao, S. (2019). Landscape of systemic therapy for ovarian cancer in 2019: Primary therapy. *Cancer* *125 Suppl 24*, 4582-4586.

29. Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *Journal of cellular physiology* *195*, 346-355.
30. Garcia, A., Oza, A., Hirte, H., Fleming, G., Tsao-Wei, D., Roman, L., Swenson, S., Gandara, D., Scudder, S., and Morgan, R. (2005). Interim report of a phase II clinical trial of bevacizumab (Bev) and low dose metronomic oral cyclophosphamide (mCTX) in recurrent ovarian (OC) and primary peritoneal carcinoma: a California Cancer Consortium Trial. *Journal of Clinical Oncology* *23*, 5000-5000.
31. Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F., and Stern, P.L. (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunology today* *14*, 491-499.
32. Gerok, W. (2013). *Aszites: Pathophysiologie—Diagnostik—Therapie* (Springer-Verlag).
33. Giger, E.V., Castagner, B., Rääkkönen, J., Mönkkönen, J., and Leroux, J.C. (2013). siRNA transfection with calcium phosphate nanoparticles stabilized with PEGylated chelators. *Advanced healthcare materials* *2*, 134-144.
34. Giljohann, D.A., Seferos, D.S., Daniel, W.L., Massich, M.D., Patel, P.C., and Mirkin, C.A. (2010). Gold nanoparticles for biology and medicine. *Angewandte Chemie International Edition* *49*, 3280-3294.
35. Gottschalk, N., Kimmig, R., Lang, S., Singh, M., and Brandau, S. (2012). Anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies overcome resistance of ovarian cancer cells to targeted therapy and natural cytotoxicity. *Int J Mol Sci* *13*, 12000-12016.
36. Greppi, M., Tabellini, G., Patrizi, O., Candiani, S., Decensi, A., Parolini, S., Sivori, S., Pesce, S., Paleari, L., and Marcenaro, E. (2019). Strengthening the AntiTumor NK Cell Function for the Treatment of Ovarian Cancer. *Int J Mol Sci* *20*.
37. Groh, V., Wu, J., Yee, C., and Spies, T. (2002). Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* *419*, 734.
38. Heiss, M.M., Murawa, P., Koralewski, P., Kutarska, E., Kolesnik, O.O., Ivanchenko, V.V., Dudnichenko, A.S., Aleknaviciene, B., Razbadauskas, A., and Gore, M. (2010). The trifunctional antibody catumaxomab for the treatment of malignant ascites due to epithelial cancer: results of a prospective randomized phase II/III trial. *International journal of cancer* *127*, 2209-2221.
39. Herbst, R.S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics* *59*, S21-S26.
40. Herbst, R.S., and Langer, C.J. (2002). Epidermal growth factor receptors as a target for cancer treatment: the emerging role of IMC-C225 in the treatment of lung and head and neck cancers. Paper presented at: Seminars in oncology (Elsevier).
41. Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006a). Soluble MICA in malignant diseases. *International journal of cancer* *118*, 684-687.
42. Holdenrieder, S., Stieber, P., Peterfi, A., Nagel, D., Steinle, A., and Salih, H.R. (2006b). Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunology, Immunotherapy* *55*, 1584-1589.

43. Hrvat, A., Schmidt, M., Obholzer, M., Benders, S., Kollenda, S., Epple, M., Brandau, S., and Mallmann-Gottschalk, N. (2022). Reactivity of NK cells against ovarian cancer cells is maintained in the presence of calcium phosphate nanoparticles. *Frontiers in Immunology*, 479.
44. Hu, J., Kovtun, A., Tomaszewski, A., Singer, B.B., Seitz, B., Epple, M., Steuhl, K.-P., Ergün, S., and Fuchsluger, T.A. (2012). A new tool for the transfection of corneal endothelial cells: calcium phosphate nanoparticles. *Acta biomaterialia* 8, 1156-1163.
45. Jordan, A. (2001). Nanotechnologie—ein neues Konzept für Diagnostik und Therapie maligner Tumoren. *Der Onkologe* 7, 1073-1081.
46. Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P., Ward, C.W., and Burgess, A.W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp Cell Res* 284, 31-53.
47. Kampan, N.C., Madondo, M.T., McNally, O.M., Stephens, A.N., Quinn, M.A., and Plebanski, M. (2017). interleukin 6 Present in inflammatory ascites from advanced epithelial Ovarian cancer Patients Promotes Tumor necrosis Factor receptor 2-expressing regulatory T cells. *Frontiers in immunology* 8, 1482.
48. Kaufman, D., Schoon, R., and Leibson, P. (1993). MHC class I expression on tumor targets inhibits natural killer cell-mediated cytotoxicity without interfering with target recognition. *The Journal of Immunology* 150, 1429-1436.
49. Kaufmann, M., Costa, S.-D., and Scharl, A. (2012). *Die Gynäkologie, Vol 3* (Springer-Verlag Berlin Heidelberg).
50. Kessler, A. (2011). *Die Bedeutung der Deubiquitinierung für den intrazellulären Transport von Membranproteinen und bei Signaltransduktionswegen* (diplom. de).
51. Kim, K.-S., Han, J.-H., Park, J.-H., Kim, H.-K., Choi, S.H., Kim, G.R., Song, H., An, H.J., Han, D.K., and Park, W. (2019). Multifunctional nanoparticles for genetic engineering and bioimaging of natural killer (NK) cell therapeutics. *Biomaterials* 221, 119418.
52. Kipps, E., Tan, D.S., and Kaye, S.B. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews Cancer* 13, 273-282.
53. Klinke, R., Pape, H.-C., Kurtz, A., Silbernagl, S., Baumann, R., Brenner, B., Gay, R., and Rothenburger, A. (2010). *Physiologie* (6., vollständig überarb. Aufl. ed.). Stuttgart [ua]: Thieme.
54. Knuschke, T., Sokolova, V., Rotan, O., Wadwa, M., Tenbusch, M., Hansen, W., Staeheli, P., Epple, M., Buer, J., and Westendorf, A.M. (2013). Immunization with biodegradable nanoparticles efficiently induces cellular immunity and protects against influenza virus infection. *The Journal of Immunology*, 1202654.
55. Koch, J., Steinle, A., Watzl, C., and Mandelboim, O. (2013). Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends in immunology* 34, 182-191.
56. Kollenda, S. (2020). *Calcium phosphate nanoparticles for biomedical applications* (Dissertation, Duisburg, Essen, Universität Duisburg-Essen, 2020).
57. Komatsu, F., and Tamiya, H. (1998). Relationship between antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity due to anti-HTLV-1 and negative signal of major histocompatibility complex class I antigens on adult T-cell leukemia cell lines. *Oncol Res* 10, 59-67.

58. Kononenko, V., Narat, M., and Drobne, D. (2015). Nanoparticle interaction with the immune system. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* 66.
59. Konstantinopoulos, P.A., Waggoner, S.E., Vidal, G.A., Mita, M.M., Fleming, G.F., Holloway, R.W., Van Le, L., Sachdev, J.C., Chapman-Davis, E., and Colon-Otero, G. (2018). TOPACIO/Keynote-162 (NCT02657889): a phase 1/2 study of niraparib+ pembrolizumab in patients (pts) with advanced triple-negative breast cancer or recurrent ovarian cancer (ROC)—results from ROC cohort (American Society of Clinical Oncology).
60. Kozlova, D., Chernousova, S., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A.M., and Epple, M. (2012). Cell targeting by antibody-functionalized calcium phosphate nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry* 22, 396-404.
61. Krauß, T., Osmers, R., Meden, H., Ravens, G., Martin, M., and Kuhn, W. (1997). Die Bedeutung des Lymphknotenstatus für das Überleben von Patientinnen mit Ovarialkarzinom im klinischen Stadium III. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 57, 349-352.
62. Kumar, D., Mutreja, I., Chitcholtan, K., and Sykes, P. (2017). Cytotoxicity and cellular uptake of different sized gold nanoparticles in ovarian cancer cells. *Nanotechnology* 28, 475101.
63. Kumar, S. (2018). Natural killer cell cytotoxicity and its regulation by inhibitory receptors. *Immunology* 154, 383-393.
64. Kwak-Kim, J., and Gilman-Sachs, A. (2008). Clinical implication of natural killer cells and reproduction. *American journal of reproductive immunology* 59, 388-400.
65. Lane, D., Matte, I., Rancourt, C., and Piché, A. (2011). Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients. *BMC cancer* 11, 1-6.
66. Lanier, L.L. (1998). NK cell receptors. *Annual review of immunology* 16, 359-393.
67. Lanier, L.L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nature immunology* 9, 495.
68. Le Garff-Tavernier, M., Béziat, V., Decocq, J., Siguret, V., Gandjbakhch, F., Pautas, E., Debré, P., Merle-Beral, H., and Vieillard, V. (2010). Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging cell* 9, 527-535.
69. Lechardeur, D., Verkman, A., and Lukacs, G.L. (2005). Intracellular routing of plasmid DNA during non-viral gene transfer. *Advanced drug delivery reviews* 57, 755-767.
70. Li, J., Chen, Y.-C., Tseng, Y.-C., Mozumdar, S., and Huang, L. (2010). Biodegradable calcium phosphate nanoparticle with lipid coating for systemic siRNA delivery. *Journal of controlled release* 142, 416-421.
71. Ljunggren, H.-G., and Kärre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today* 11, 237-244.
72. Louis, C., and Pluchery, O. (2012). *Gold nanoparticles for physics, chemistry and biology* (World Scientific).
73. Madjd, Z., Spendlove, I., Pinder, S.E., Ellis, I.O., and Durrant, L.G. (2005). Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *International journal of cancer* 117, 248-255.



74. Malhotra, A., and Shanker, A. (2011). NK cells: immune cross-talk and therapeutic implications. *Immunotherapy* 3, 1143-1166.
75. Matte, I., Garde-Granger, P., Bessette, P., and Piché, A. (2019). Ascites from ovarian cancer patients stimulates MUC16 mucin expression and secretion in human peritoneal mesothelial cells through an akt-dependent pathway. *BMC cancer* 19, 1-14.
76. Matte, I., Lane, D., Laplante, C., Rancourt, C., and Piché, A. (2012). Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *American journal of cancer research* 2, 566.
77. Mendelsohn, J., and Baselga, J. (2003). Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *Journal of clinical oncology* 21, 2787-2799.
78. Moreno, M., Bontkes, H.J., Scheper, R.J., Kenemans, P., Verheijen, R.H., and von Mensdorff-Pouilly, S. (2007). High level of MUC1 in serum of ovarian and breast cancer patients inhibits huHMFG-1 dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). *Cancer letters* 257, 47-55.
79. Moscatello, D.K., Holgado-Madruga, M., Godwin, A.K., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P.W., Biegel, J.A., Hayes, R.L., and Wong, A.J. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* 55, 5536-5539.
80. Murphy, K., and Weaver, C. (2018). *Janeway immunologie* (Springer-Verlag).
81. Murphy, M., Ting, K., Zhang, X., Soo, C., and Zheng, Z. (2015). Current development of silver nanoparticle preparation, investigation, and application in the field of medicine. *Journal of Nanomaterials* 2015, 5.
82. Nakamura, H., Hanafusa, N., Kitamura, K., Nakamura, H., Sekihara, H., Shimizu, K., Anayama, M., Makino, Y., Tamura, K., and Nagasawa, M. (2020). Biochemical evaluation of processed ascites in patients undergoing cell-free and concentrated ascites reinfusion therapy. *Ther Apher Dial* 24, 516-523.
83. Neuhaus, B., Tosun, B., Rotan, O., Frede, A., Westendorf, A.M., and Epple, M. (2016). Nanoparticles as transfection agents: a comprehensive study with ten different cell lines. *RSC Advances* 6, 18102-18112.
84. Nguyen, K.T. (2011). Targeted nanoparticles for cancer therapy: promises and challenge.
85. Nicholson, R., Gee, J., and Harper, M. (2001). EGFR and cancer prognosis. *European journal of cancer* 37, 9-15.
86. Nowak, M., Glowacka, E., Szpakowski, M., Szylo, K., Malinowski, A., Kulig, A., Tchorzewski, H., and Wilczynski, J. (2010). Proinflammatory and immunosuppressive serum, ascites and cyst fluid cytokines in patients with early and advanced ovarian cancer and benign ovarian tumors. *Neuroendocrinology Letters* 31, 375-383.
87. Oh, S.-K., and Moolten, F. (1981). Nonspecific immunosuppressive factors in malignant ascites: further characterization and possible relationship to erythrocyte receptors of human peripheral T cells. *The Journal of Immunology* 127, 2300-2307.
88. Onkologie, L. (2019). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 4.0, 2020, AWMF-Registernummer: 032/035OL. Im Internet: [https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/Stand 10](https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/Stand%2010).

89. Ozols, R.F., Bundy, B.N., Greer, B.E., Fowler, J.M., Clarke-Pearson, D., Burger, R.A., Mannel, R.S., DeGeest, K., Hartenbach, E.M., and Baergen, R. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol* 21, 3194-3200.
90. Pape, G.R., Hadam, M.R., Eisenburg, J., Hofschneider, P.-H., and Riethmüller, G. (1980). *Natürliche Zytotoxizität beim Menschen: Stimulation in vivo durch Interferon* (Munich: J.F. Bergmann-Verlag).
91. Patil, N., Abba, M., and Allgayer, H. (2012). Cetuximab and biomarkers in non-small-cell lung carcinoma. *Biologics: targets & therapy* 6, 221.
92. Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., and Kurzeder, C. (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. *New England Journal of Medicine* 365, 2484-2496.
93. Perussia, B., Trinchieri, G., Jackson, A., Warner, N., Faust, J., Rumpold, H., Kraft, D., and Lanier, L. (1984). The Fc receptor for IgG on human natural killer cells: phenotypic, functional, and comparative studies with monoclonal antibodies. *The Journal of Immunology* 133, 180-189.
94. Petri, E., and Stranz, G. (2007). Ovarialkarzinom-Rezidiv. *Tipps und Tricks für den Frauenarzt: Problemlösungen von A bis Z*, 153-155.
95. Riggs, M.J., Pandalai, P.K., Kim, J., and Dietrich, C.S. (2020). Hyperthermic Intraperitoneal Chemotherapy in Ovarian Cancer. *Diagnostics (Basel)* 10.
96. Robert Koch-Institut, and e.V., G.d.e.K.i.D. (2019). *Krebs in Deutschland 2015/2016* (Robert Koch-Institut).
97. Román, V.R.G., Murray, J.C., and Weiner, L.M. (2013). Antibody Fc: Chapter 1. *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity (ADCC)* (Elsevier Inc. Chapters).
98. Romee, R., Foley, B., Lenvik, T., Wang, Y., Zhang, B., Ankarlo, D., Luo, X., Cooley, S., Verneris, M., and Walcheck, B. (2013). NK cell CD16 surface expression and function is regulated by a disintegrin and metalloprotease-17 (ADAM17). *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* 121, 3599-3608.
99. Salih, H.R., Rammensee, H.-G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *The Journal of Immunology* 169, 4098-4102.
100. Salomon, D.S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical reviews in oncology/hematology* 19, 183-232.
101. Samuelsson, A., Towers, T.L., and Ravetch, J.V. (2001). Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science* 291, 484-486.
102. Scheffel, F., Knuschke, T., Otto, L., Kollenda, S., Sokolova, V., Cosmovici, C., Buer, J., Timm, J., Epple, M., and Westendorf, A.M. (2020). Effective Activation of Human Antigen-Presenting Cells and Cytotoxic CD8+ T Cells by a Calcium Phosphate-Based Nanoparticle Vaccine Delivery System. *Vaccines* 8, 110.
103. Schneider-Merck, T., van Bueren, J.J.L., Berger, S., Rossen, K., van Berkel, P.H., Derer, S., Beyer, T., Lohse, S., Bleeker, W.K., and Peipp, M. (2010). Human IgG2 antibodies against epidermal

growth factor receptor effectively trigger antibody-dependent cellular cytotoxicity but, in contrast to IgG1, only by cells of myeloid lineage. *The journal of immunology* 184, 512-520.

104. Schwörer, A.-M. (2016). Analyse von Zytokinen im Aszites des Ovarialkarzinoms und Assoziationen mit der klinischen Progression.

105. Shann, S.Y., Lau, C.M., Thomas, S.N., Jerome, W.G., Maron, D.J., Dickerson, J.H., Hubbell, J.A., and Giorgio, T.D. (2012). Size-and charge-dependent non-specific uptake of PEGylated nanoparticles by macrophages. *International journal of nanomedicine* 7, 799.

106. Slamon, D.J., Godolphin, W., Jones, L.A., Holt, J.A., Wong, S.G., Keith, D.E., Levin, W.J., Stuart, S.G., Udove, J., Ullrich, A., and Press M.F. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244, 707-712.

107. Sokolova, V., and Epple, M. (2008). Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells. *Angewandte chemie international edition* 47, 1382-1395.

108. Sokolova, V., and Epple, M. (2011). Synthetic pathways to make nanoparticles fluorescent. *Nanoscale* 3, 1957-1962.

109. Sokolova, V., and Epple, M. (2021). Biological and medical applications of calcium phosphate nanoparticles. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 27, 7471.

110. Sokolova, V., Kozlova, D., Knuschke, T., Buer, J., Westendorf, A.M., and Epple, M. (2013). Mechanism of the uptake of cationic and anionic calcium phosphate nanoparticles by cells. *Acta biomaterialia* 9, 7527-7535.

111. Sokolova, V., Rojas-Sánchez, L., Białas, N., Schulze, N., and Epple, M. (2019). Calcium phosphate nanoparticle-mediated transfection in 2D and 3D mono-and co-culture cell models. *Acta biomaterialia* 84, 391-401.

112. Sokolova, V., Rotan, O., Klesing, J., Nalbant, P., Buer, J., Knuschke, T., Westendorf, A.M., and Epple, M. (2012). Calcium phosphate nanoparticles as versatile carrier for small and large molecules across cell membranes. *Journal of Nanoparticle Research* 14, 1-10.

113. Sokolova, V.V., Radtke, I., Heumann, R., and Epple, M. (2006). Effective transfection of cells with multi-shell calcium phosphate-DNA nanoparticles. *Biomaterials* 27, 3147-3153.

114. Staebler, A., and Mayr, D. (2017). Update der S3-Leitlinie für maligne Ovarialtumoren 2016. *Der Pathologe* 38, 331-344.

115. Stanker, L.H., Vanderlaan, M., and Juarez-Salinas, H. (1985). One-step purification of mouse monoclonal antibodies from ascites fluid by hydroxylapatite chromatography. *Journal of immunological methods* 76, 157-169.

116. Steinle, A., Li, P., Morris, D.L., Groh, V., Lanier, L.L., Strong, R.K., and Spies, T. (2001). Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53, 279-287.

117. Sutthavas, P., Birgani, Z.T., Habibovic, P., and van Rijt, S. (2021). Calcium Phosphate Coated and Strontium Incorporated Mesoporous Silica Nanoparticles can Effectively Induce Osteogenic Stem Cell Differentiation. *Advanced Healthcare Materials*, 2101588.

118. Temchura, V.V., Kozlova, D., Sokolova, V., Überla, K., and Epple, M. (2014). Targeting and activation of antigen-specific B-cells by calcium phosphate nanoparticles loaded with protein antigen. *Biomaterials* 35, 6098-6105.
119. Tonetti, C.R., de Souza-Araújo, C.N., Yoshida, A., da Silva, R.F., Alves, P.C.M., Mazzola, T.N., Derchain, S., Fernandes, L.G.R., and Guimarães, F. (2021). Ovarian Cancer-Associated Ascites Have High Proportions of Cytokine-Responsive CD56bright NK Cells. *Cells* 10.
120. Tsai, C.-P., Chen, C.-Y., Hung, Y., Chang, F.-H., and Mou, C.-Y. (2009). Monoclonal antibody-functionalized mesoporous silica nanoparticles (MSN) for selective targeting breast cancer cells. *Journal of Materials Chemistry* 19, 5737-5743.
121. Tsibulak, I., Zeimet, A.G., and Marth, C. (2019). Hopes and failures in front-line ovarian cancer therapy. *Critical reviews in oncology/hematology* 143, 14-19.
122. Tuijnman, W.B., Capel, P., and Van de Winkel, J. (1992). Human low-affinity IgG receptor Fc gamma RIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes. *Blood* 79, 1651-1656.
123. Velard, F., Braux, J., Amedee, J., and Laquerriere, P. (2013). Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: an overview. *Acta biomaterialia* 9, 4956-4963.
124. Verbeek, B.S., Adriaansen-Slot, S.S., Vroom, T.M., Beckers, T., and Rijksen, G. (1998). Overexpression of EGFR and c-erbB2 causes enhanced cell migration in human breast cancer cells and NIH3T3 fibroblasts. *FEBS letters* 425, 145-150.
125. Vergote, I., Harter, P., and Chiva, L. (2019). Hyperthermic intraperitoneal chemotherapy does not improve survival in advanced ovarian cancer. *Cancer* 125 Suppl 24, 4594-4597.
126. Vidarsson, G., Dekkers, G., and Rispen, T. (2014). IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. *Frontiers in immunology* 5, 520.
127. Vis, B., Hewitt, R.E., Faria, N., Bastos, C., Chappell, H., Pele, L., Jugdaohsingh, R., Kinrade, S.D., and Powell, J.J. (2018). Non-functionalized ultrasmall silica nanoparticles directly and size-selectively activate T cells. *ACS nano* 12, 10843-10854.
128. Vivier, E., Nunès, J.A., and Vély, F. (2004). Natural killer cell signaling pathways. *Science* 306, 1517-1519.
129. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C., and Brossay, L. (2012). Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* 12, 239-252.
130. Vyas, M., Reinartz, S., Hoffmann, N., Reiners, K.S., Lieber, S., Jansen, J.M., Wagner, U., Müller, R., and von Strandmann, E.P. (2017). Soluble NKG2D ligands in the ovarian cancer microenvironment are associated with an adverse clinical outcome and decreased memory effector T cells independent of NKG2D downregulation. *Oncoimmunology* 6, e1339854.
131. Wang, K., Li, D., and Sun, L. (2016). High levels of EGFR expression in tumor stroma are associated with aggressive clinical features in epithelial ovarian cancer. *Onco Targets Ther* 9, 377-386.
132. Wang, P., Zhao, L., Liu, J., Weir, M.D., Zhou, X., and Xu, H.H. (2014). Bone tissue engineering via nanostructured calcium phosphate biomaterials and stem cells. *Bone research* 2, 14017.

133. Webb, T.J., Giuntoli, R.L., Rogers, O., Schneck, J., and Oelke, M. (2008). Ascites specific inhibition of CD1d-mediated activation of natural killer T cells. *Clinical Cancer Research* 14, 7652-7658.
134. Wimberger, P., Kasimir-Bauer, S., Jäger, M., Schulte, A., Lindhofer, H., and Kimmig, R. (2005). Einfluss der intraperitonealen Immuntherapie mit dem trifunktionalen, bispezifischen Antikörper Catumaxomab (anti-EpCAM x anti-CD3) bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom auf disseminierte Tumor-und Immuneffektorzellen. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde* 66, FV5\_2.
135. Yang, S.T., Liu, Y., Wang, Y.W., and Cao, A. (2013). Biosafety and bioapplication of nanomaterials by designing protein–nanoparticle interactions. *Small* 9, 1635-1653.
136. Yunusova, N.V., Stakheyeva, M.N., Molchanov, S.V., Afanas'ev, S.G., Tsydenova, A.A., Kolomiets, L.A., and Cherdyn'tseva, N.V. (2018). Functional activity of natural killer cells in biological fluids in patients with colorectal and ovarian cancers. *Cent Eur J Immunol* 43, 26-32.

## 7 TABELLARISCHER ANHANG

## Reagenzien

Ampuwa Spüllösung 1000ml Plastipur	Fresenius Kabi Hersteller: Fresenius Kabi France; 5 place du Marivel- F-92310 Sèvres
Aqua B. Braun Lot: 172328001	B. Braun Melsungen AG 34209 Melsungen-D
autoMACS Rinsing Solution Lot: 5170905201	MACS Miltenyi Biotec
BD Golgi Stop; Protein Transport Inhibitor Lot: 5267585	BD Biosciences
Bench Mark Prestained Protein Standard Cat.No.:10748-010 Number of Markers: 10 (6 – 180 kDa)	Novex by life technologies
Bicoll Separating Solution; 1,077 g/ml density	Biochrom GmbH Leonorenst. 2-6, 12247 Berlin
Biotin Mouse anti-human IgG1, 0,5mg/ml Material No. 555869 Clone: 617-1 Isotype: Mouse IgG2b,k	BD Pharmingen, BD Biosciences
Bv421 mouse anti-human CD56, 12µg/ml, 1:50 Lot: 6007717 Isotyp: mouse (MALB/c) IgG2b,k Clone: NCAM 16..2	BD Biosciences
Casy Clean 50ml Lot: 1786170503	
CasyTon, REF 5651808 Lot: 177703	OMNI Life Science GmbH + Co. KG Bremen
Cetuximab, Erbitux 5mg/ml 7872371177	Merck (Serono)
Dimethylsulfoxid (DMSO) Rotipuran >99,8 %	Carl Roth GmbH + Co. KG Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe
EDTA	Merck
Ethanol	Merck
Fetal Bovin Serum	Biochrom GmbH Leonorenstr. 2-6, 12247 Berlin
FITC Mouse anti-human CD107a 0,5µg/test = 25µg/ml Lot: 6266751 Clone:H4A3 Isotype: Mouse IgG1,k	BD Pharmingen – BD Bioscience
Gibco DPBS (1x) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline [-] CaCl <sub>2</sub> , [-] MgCl <sub>2</sub>	Life Technologies Limited 3 Fountain Drive, Paisley, PA4 9RF, UK
HLA Class I (ABC) RPE, 200µg/ml, 1:200 Clone: W6/32 Isotype: mouse IgG2a,k	Dako
HLA-A Silencer select pre designed siRNA 5nmole+water	Ambion
HLA-B Silencer select pre designed siRNA 5nmole+water	Ambion

HRPO Streptavidin Reactive Biotin	Dianova
Humanserum	Transfusionsmedizin Universitätsmedizin Essen
IgG Elution Buffer Lot: SG251503	Thermo Scientific 3747 N. Menden Rd., Rockford, IL61101 USA
IL-18 10 ng/ml	MBL
LEAF Purified anti-human HLA-A,B,C 1 mg/ml Clone: W6/32 Lot: B148491	BioLegend
Lipofectamine 2000 Lot: 1875898	Invitrogen by Thermo Fisher scientific Hergestellt: 5791 Van Allen Way Carlsbad
MICA APC, 5µg/ml, 1:100 Clone: 159227 Isotype: mouse IgG2b	R6D Systems/biothane
Monensin	BD Biosciences
Mouse IgG2a PE, 50µg/ml Clone: 6155-178	BD Biosciences
Mouse IgG2b APC, 200µg/ml	BD Biosciences
Mouse IgG2b PE 25-50µg/ml	BD Biosciences
MTT 5mg/ml in PBS Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma Life Scientific Sigma-Aldrich Co. 3050 Spruce Street St. Louis
Natriumazid, reinst Lot: 7O008075	AppliChem GmbH Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt
NK cell isolation Kit human	Miltenyi Biotec Miltenyi Biotec GmbH; Friedrich-Ebert-Str.68, 51429 Bergisch Gladbach
Paraformaldehyd, reinst	Merck KGaA 64271 Darmstadt, Germany
PE Mouse Anti-Human EGF Receptor, 3µg/ml, 1:10 Lot: 426933 Clone: EGFR.1 Isotype: Mouse IgG2b,k	BD Bioscience
Pen Strep (Penicillin Streptomycin D)	Gibco by Life Technologies Hergestellt: Gran Island, NY 14072 USA
Purified mouse IgG2a, k isotype ctrl 0,5 mg/ml Clone: MOPC-173 Lot: B153642	BioLegend
rhIgG1 Fc, 100µg Lot: EAX0616051	Minneapolis, MN 55413
RhIL-15, 50µg Lot: 352302	Immuno Tools
RPMI Medium 140 (1x) [+] L-Glutamin	Gibco by life technologies
Silencer Select negative Control 5nmole+water	Ambion
Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder Number of Markers: 10 (10 – 260 kDa)	Thermo Scientific
Stem Pro® Accutase	Gibco by Life Technologies
TEMED	BioRad Laboratories

	Made in United States
Terralin liquid Lot: 1501095	Schülke&Mayr GmbH Robert-Koch Str.2, 22851 Nordstedt Germany
Tween 20; M: 1227,72 g/mol Lot: 5R015150	AppliChem Panreact Ottoweg 4, DE-64291 Darmstast

Geräte

10ml in 1/10ml Serological pipette Lot: F17093B4	Greiner bio-one Cellstar
12 Well Cell Culture Plate Lot: E171O3BR	Greiner bio-one cellstar
15ml Tubes: Röhre 15ml; 120x17mm, PP Lot: 7044912	Sarstedt AG&Co. Sarstedtstr. 1, D-51588 Nümbrecht
1ml Spritze, Omnican F Lot: 15A26C8	B. Braun Melsungen AG OPM Carl-Braun-Str.1, 34212 Melsungen
25ml in 2/10ml Serological pipette Lot: F171139Y	Greiner bio-one Cellstar
50ml Tubes: Cellstar Tubes Lot E17O13611	Greiner bio-one
5ml in 1/10ml Serological pipette Lot:F171133T	Greiner bio-one Cellstar
96 Well Cell Culture Plate, steril, u-bottom, with lid Lot:E171O36U	Greiner bio-one Cellstar
96 Well Cell Culure Plate, steril, F- bottom, with lid Lot: E17O43GS	Greiner bio-one Cellstar
Axioskop 2 Ser. Nr.: 801886	Carl Zeiss
BD FACS Canto II Flow Cytometer 338960	BD Bioscience
BD FACSDiva Software 6.0	BD Bioscience
Biosphere® Pipettenspitzen 10µl, farblos Lot: 5079/6107003	Sarstedt Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht
Biosphere® Pipettenspitzen 1000µl	Sarstedt AG&Co. Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht
Biosphere® Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt Sarstedtstr.1, 51588 Nümbrecht
Block heater SBH130D	Stuart Made in UK
Casy Arbeitsset	Roche Innovatis AG
Casy Cell Counter + Analyse System Modell Casy Model TT Ser. No.:TT-2HA-1399	Roche Innovatis AG Made in Germany Innovates AG; Krämerstr.22, D-72764 Reutlingen
Casy rack	Roche Innovatis AG
Combitips advanced 0,2ml, steril Lot:G173257M	Eppendorf AG 22331 Hamburg
Combitips advanced 5ml, steril	Eppendorf AG



Lot:6171129H	22331 Hamburg
Combitips advanced 5ml, unsterile Lot:61742060	Eppendorf AG 22331 Hamburg
Einmalspritzen 10ml, steril Lot:1702	BD Discardit TM II Hergestellt: Becton Dickinson S.A. Ctra. Mequinenza, s/n.- 22520, Spain
ELISA Waschgerät Model:ELX508M	BioTec instruments Inc Highland Park, Winooski, VT 05404-0998
Eppendorf Mutipipette E3x 1µl-50ml L42718E	Made in Germany
Eppendorf xplorer, 15-300µl 424184A	Eppendorf
Filteraufsatz 500 "rapid"-Filtermax Lot: 20170163	TPP Made in Europe/Switzerland
FINNPIPETTE 30-300µl NAO2961	Thermo electron Corporation
Flockeneisbereiter Typ AF80AS	Scotsman Ice System
Gen5 1.11	BioTek
Glass Pasteur Pipettes, 145mm	Brand GmbH + Co. Otto-Schott-Str.25, 97877 Wertheim
Glass Pasteur Pipettes, 230mm	Brand GmbH + Co. Otto-Schott-Str.25, 97877 Wertheim
Große Zentrifuge; Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Inkubator: HERACell 240 CO2 inkubator	Thermo scientific
Kleine Zentrifuge; Micro 200R	Hettich Zentrifugen
LS Columns Lot: 5170724011	Miltenyi; Biotec GmbH Fridrich-Ebert-Str. 668, 51429 Bergisch Gladbach
MACS Multi stand, quadroMACS No.: 007583	Miltenyi; Biotec GmbH
Mikroskop: Olympus CK2 Modell CK2-TR	Olympus optical Co.
Mittlere Zentrifuge; Universal 320	Hettich Zentrifugen
Nunc Maxi Sorp F96	Thermo Fisher Scientific Made in Denmark
Objektträger, superfrost plus Lot: 040317	Menzel-Gläser Thermo scientific Hergestellt: Gerhard Menzel B.v.&Co.KG; Saarbrückner Str.248, D-38116 Braunschweig
Parafim	Neenah,54956
Pierce Chromatography Cartridges Protein A/G Loz: SF253741	Thermo Scientific
Pipetten: 10, 100, 1000	Eppendorf research plus
Pipettenspitzen 300µl, farblos Lot:0820/5288011	Sarstedt Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht
Pipetus-Akku 81111218	HIRSCHMANN Laborgeräte
PowerPac Basic Serial No. 041BR	Bio Rad Made in USA
Pumpe	KnT Lab Laboport
Reagiergefäß 1,5ml	Sarstedt AG&Co.

Lot: 7083311	Sarstedtstr.1, 51588 Nümbrecht
Safe seat Reagiergefäß 2ml, PP Lot:0000/4219001	Sarstedt Aktiengesellschaft D-51588 Nümbrecht
Schüttler ST 5 CAT	HeoLab Laborspezialprodukte Heidelberg
Synergy 2	BioTec
TC-Flasche T175, Cell + Bel. Kap., steril	Sarstedt; Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht Made in Germany
TC-Flasche T75, Cell + Bel. Kap., steril	Sarstedt; Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht Made in Germany
TC-Flaschen T25, Cell + Bel. Kap., steril	Sarstedt; Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht Made in Germany
TC-Platte 24 Well, Standard, F Lot:7022411	Sarstedt Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht
TC-Platte 6 Well, Standard F Lot:6024911	Sarstedt Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht
Transferpipette 3,5ml, steril Lot: 7320411	Sarstedt Sarstedtstr.1, D-51588 Nümbrecht
Vortex, VTX.3000L	Mixer Uzusio LMS
Wasserbad	Oehmen Labortechnik Niederstr. 9-11, 45141 Essen

Verwendete Puffer & hergestellte Lösungen

10x Laemli - Laufpuffer	30g Tris Base 144g Glycin 10g SDS Ad 1L
10xPBS	80g NaCl 2g KCl 11,5g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Ad 1L → pH 7,3
5xSDS Sample Buffer	1) 250mM Tris pH 6,8 → 3,04g Tris-HCl für 100ml 2) 4 % SDS in 250mM Tris pH 6,8 lösen und filtrieren 3) 72 % Tris pH 6,8 / SDS 20 % Glycerin 8 % β-Mercapthoethanol mischen 0,2 % Bromphenolblau dazu
Azid-PBS + 3% Humanserum	150 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15 mM NaN <sub>3</sub> 3% Humanserum pH 7,4
BD u. eBioscience 1x Assay Diluent	100ml 5xAssay Diluent 400ml a.dest
Coomassie Fixation solution	50 % MetOH            250ml 10 % Acetic Acid    50ml Ad                        500ml



## 8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
ADCC	antibody dependent cytotoxicity
AK	Antikörper
Asc	Aszites
BSA	Bovine Serum Albumin
Bzw.	beziwhungsweise
CD	Cluster of differentiation
CD107a	s. LAMP-1
Cet	Cetuximab
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate buffered saline
EGF	Epidermal-Growth-Factor
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Flourescence-activated-cell-sorter
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HLA	Human Leukocyte Antigen
HS	Humanserum
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin Klasse G
IgM	Immunglobulin Klasse M
IL	Interleukin
kDa	Kilo Dalton = atomare Masseneinheit
LAMP-1	Lysosomal-associated membrane protein-1
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
Max.	maximal
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIC	MHC class I chain-related Proteins
Min.	mindestens

---

MOI	Multiplicity of infection
n=	Anzahl der Experimente
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NP	Nanopartikel
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffer saline
PFA	Paraformaldehyd
PFU	Plaque-forming unit
P/S	Penicillin und Steptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
Rxx10	Verwendetes Standardmedium
SD	Standardabweichung
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TZ	Tumorzellen
VEGF	Angiogenese-Wachstumsfaktor

## 9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 1	S. 8	Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsfällen in Deutschland 2016
Abbildung 2	S. 9	Verteilung der UICC-Stadien bei Erstdiagnose des Ovarialkarzinoms
Abbildung 3	S. 14	Gesamtüberleben beim Ovarialkarzinom in Abhängigkeit der FIGO Stadien und des postoperativen Tumorrestes
Abbildung 4	S. 18	Funktion des EGF-Rezeptors
Abbildung 5	S. 19	Wirkungsweise des Antikörpers Cetuximab am EGF-Rezeptor
Abbildung 6	S. 21	Aktivierungsprozess von NK-Zellen durch unterschiedliche Rezeptoren
Abbildung 7	S. 22	Zytokinstimulation sowie natürliche und antikörper-vermittelte zelluläre Zytotoxizität bei NK-Zellen
Abbildung 8	S. 24	a) Aufbau von dreischaligen CaP-NP b) elektronenmikroskopisches Bild von CaP-NP
Abbildung 9	S. 26	Schematische Darstellung der Aufnahme von CaP-NP in Zelle
Abbildung 10	S. 40-41	Bestimmung der MHC-I-, MIC A und EGFR-Expression
Abbildung 11	S. 42	Vergleich der natürlichen und der antikörper-vermittelten NK-Zytotoxizität (ADCC) bei Ovarialkarzinomzellen
Abbildung 12	S. 44	MICA-Expression von IGROV-1 vor und nach Transduktion von MIC A
Abbildung 13	S. 45	NK-Zytotoxizität nach MIC A-Transduktion
Abbildung 14	S. 46	Natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC bei OVCAR-3 nach MHC-I-Inhibition
Abbildung 15	S. 47	Natürliche Zytotoxizität (a) und ADCC (b) von stimulierten NK-Zellen gegenüber OVCAR-3- Zellen nach Behandlung mit anti-MHC-I-Antikörpern
Abbildung 16	S. 48-49	Natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC nach Transfektion von Ovarialkarzinomzellen mit anti-MHC-I-RNA und zugehöriger MHC-I-Rezeptorexpression
Abbildung 17	S. 49	MHC-I-Rezeptorexpression nach Transfektion mit anti-MHC-I-siRNA
Abbildung 18	S. 51	Darstellung der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme von Nanopartikeln mit und ohne konjugiertem Cetuximab.
Abbildung 19	S. 52	Einfluss von NP auf die natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC.
Abbildung 20	S. 53	Durchflusszytometrische Messung der NK-Zell-Degranulation nach Inkubation mit Nanopartikeln
Abbildung 21	S. 54	Natürliche NK-Zytotoxizität und ADCC gegenüber anti-MHC-I-NP-transfizierten Ovarialkarzinomzellen
Abbildung 22	S. 55-56	NK-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen nach Transfektion mit Cetuximab-funktionalisierten NP (NP+Cet)
Abbildung 23	S. 58	Natürliche NK-Zytotoxizität und Antikörper-abhängige Zytotoxizität (ADCC) bei Anwesenheit von Aszites
Abbildung 24	S. 59	Semiquantitative IgG1-Bestimmung per ELISA aus verschiedenen Aszitesproben
Abbildung 25	S. 60	SDS-Gel mit denaturierten (a) und nicht denaturierten (b) Antikörpern aus den Aszitesproben

Abbildung 26	S. 61	Natürliche und Antikörper-vermittelte NK-Zytotoxizität gegenüber Ovarialkarzinomzellen in Anwesenheit von eluierten Antikörpern aus den Aszitesproben
Abbildung 27	S. 63	Natürliche Zytotoxizität (a+b) und ADCC (c+d) von NK-Zellen gegenüber Ovarialkarzinomzellen in Anwesenheit von NP-vorbehandeltem Aszites.

Tabelle 1	S. 11-12	TNM- und FIGO Stadien des Ovarialkarzinoms
Tabelle 2	S. 29	Schema NK-Isolation Kit von Miltenyi
Tabelle 3	S. 30	CD107a-Degranulation Assay Standard
Tabelle 4	S. 31	CD107a-Degranulation Assay Aszites
Tabelle 5	S. 31	CD107a-Degranulation Assay CaP-NP
Tabelle 6	S. 31	CD107a-Degranulation Assay IgG-Antikörper
Tabelle 7	S. 37	SDS Trenngel
Tabelle 8	S. 37	SDS Sammelgel
Tabelle 9	S. 38	Verwendete Antikörper, Isotypen und RNA
Tabelle 10	S. 39	Aszitesproben mit Isolationsdatum
Tabelle 11	S. 39	Verwendete Nanopartikel

## 10 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen meinen großen Dank aussprechen, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt dem ELAN Promotionskolleg und der Else Kröner-Fresenius-Stiftung für die Möglichkeit und die finanziellen Unterstützung eine experimentelle Doktorarbeit durchführen zu können. Mir wurde hierdurch ein großer Einblick in die wissenschaftliche Arbeit gewährt und die Gelegenheit zur interdisziplinären Forschung ermöglicht.

Besonders danken möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. rer. nat. Brandau für die Bereitstellung meines spannenden Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung. Für die Zusammenarbeit mit verschiedenen Fachdisziplinen und die Chance mir eine Vielzahl an Techniken der Laborarbeit anzueignen möchte ich ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. Mallmann-Gottschalk für die enge Zusammenarbeit, den stetigen Austausch und die anregenden Diskussionen bedanken. Die große Hilfsbereitschaft sowie ein stetig offenes Ohr waren mit stets eine große Unterstützung.

Ebenfalls möchte ich meinen Dank an Herr Priv.-Doz. Dr. med. Buderath aussprechen, für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Des Weiteren möchte ich der Arbeitsgruppe der HNO-Forschungsabteilung meinen Dank äußern, die meine Arbeit durch ihre Unterstützung bewegt haben. Hier möchte ich Kirsten und Petra für ihre Hilfe und ihren Rat danken.

Meinen Eltern und meiner Schwester danke ich für ihre Zusprüche und Ermutigung während des Studiums und der Arbeit an dieser Dissertation, aber auch für ihren starken Rückhalt in schwierigen Zeiten.

Zudem danke ich meinen Freunden für die Aufmunterungen und den gegenseitigen Ansporn. Zuletzt möchte ich meinem Mann Kevin von Herzen für die stetigen liebevollen Worte und den Glauben an mich danken.



## 11 LEBENSLAUF

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.