

**GEORG SPEYER HAUS**  
INSTITUT FÜR TUMORBIOLOGIE  
UND EXPERIMENTELLE THERAPIE



JOHANNES GUTENBERG  
UNIVERSITÄT MAINZ

# Etablierung eines Organoid-Modells des ErbB2-positiven Mammakarzinoms zur Evaluierung einer zielgerichteten Immuntherapie mit CAR-NK-Zellen

**Dissertation**  
zur Erlangung des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Jasmin Röder**  
geboren am 27.01.1991 in Darmstadt

Mainz, Januar 2023

Dekan: Prof. Dr. Eckhard Thines

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Winfried Wels

2. Berichterstatter: Dr. Joachim Urban

Tag der mündlichen Prüfung: 08.08.2023



Für meine Familie  
in Liebe und Dankbarkeit

## Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich, Jasmin Röder, an Eides statt, die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Etablierung eines Organoid-Modells des ErbB2-positiven Mammakarzinoms zur Evaluierung einer zielgerichteten Immuntherapie mit CAR-NK-Zellen“ selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Inhalte sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die als Dissertation vorgelegte Arbeit nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht wurde.

Mainz, den \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
(Jasmin Röder)

## Zusammenfassung

Das Mammakarzinom gilt als häufigste geschlechtsspezifische Krebserkrankung weltweit und weist neben Lungenkrebs die höchste krebsbedingte Mortalitätsrate bei Frauen auf. Bei etwa 20-25 % der Patientinnen mit invasivem Brustkrebs wird eine Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 (HER2) diagnostiziert. Das ErbB2-positive Mammakarzinom ist mit einer höheren Aggressivität des Tumors und einer gesteigerten Resistenz gegen konventionelle Therapien assoziiert. Die Implementierung zielgerichteter Behandlungsansätze mit monoklonalen Antikörpern und Tyrosinkinase-Inhibitoren führte jedoch zu einer verbesserten Prognose für Patientinnen mit ErbB2-positivem Mammakarzinom. Resistenzmechanismen und ein unzureichendes Ansprechen bei bereits fortgeschrittenen Erkrankungen limitieren allerdings derzeitige Therapieansätze. Eine Immuntherapie mit adoptiv transplantierten natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) könnte eine erfolgsversprechende Alternative darstellen. NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, Tumorzellen durch natürliche Zytotoxizitätsmechanismen abzutöten. Darüber hinaus sekretieren NK-Zellen pro-inflammatorische Zytokine und nehmen so Einfluss auf das endogene Immunsystem. Als allogenes Zelltherapeutikum kann neben primären NK-Zellen gesunder Spender auch die etablierte NK-Zelllinie NK-92 klinisch eingesetzt werden. NK-92 Zellen weisen ein vorteilhaftes Aktivierungsprofil auf und zeigen eine nachweisbare Anti-Tumor-Aktivität gegen Tumorzellen verschiedenen Ursprungs. Zudem kann die Anti-Tumor-Aktivität von NK-92 Zellen durch die genetische Modifikation mit chimären Antigenrezeptoren (engl., *Chimeric antigen receptors*, CARs) weiter gesteigert werden. Die Expression eines solchen rekombinanten Transmembranproteins verleiht den Immuneffektorzellen eine definierte Antigen-Spezifität und kann somit eine gezielte Lyse von Tumorzellen auslösen. Eine in der Arbeitsgruppe Wels generierte ErbB2-spezifische CAR-NK-Zelllinie (NK-92/5.28.z) führte in immunkompetenten Mausmodellen zur Abstoßung Antigen-positiver Gliomzellen und induzierte zudem eine endogene Immunantwort, die einen immunologischen Langzeitschutz gegen erneut applizierte Tumorzellen vermittelte. Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen wurde eine klinische Phase-I-Studie (CAR2BRAIN) initiiert, in welcher NK-92/5.28.z Zellen derzeit für die Behandlung von Patienten mit rezidivierendem, ErbB2-positivem Glioblastom eingesetzt werden.

Wie oben ausgeführt, ist ErbB2 insbesondere auch beim Mammakarzinom ein relevantes Zielantigen. Entsprechend könnten NK-92/5.28.z Zellen auch einen sinnvollen Ansatz zur gezielten Behandlung von Brustkrebspatientinnen darstellen. In früheren Arbeiten wurde in herkömmlichen 2D-Zellkulturexperimenten bereits eine selektive Anti-Tumor-Aktivität der ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zelllinie gegen verschiedene Brustkrebszelllinien nachgewiesen. Da klassische 2D-Kulturen mit fortschreitender Kultivierung eine vom Ursprungsgewebe abweichende Genexpression aufweisen und

die intratumorale Heterogenität nicht ausreichend widerspiegeln, sind die daraus zu gewinnenden Erkenntnisse allerdings limitiert. Um das therapeutische Potenzial der CAR-NK-Zellen in einem klinisch relevanteren *in vitro* System zu untersuchen, war Ziel dieser Arbeit, ein auf Organoiden basierendes Modell des ErbB2-positiven Mammakarzinoms zu etablieren, das sich durch eine hohe phänotypische und funktionale Übereinstimmung mit endogenen Brustdrüsen auszeichnet. Da Organoide sich in dreidimensionale, multizelluläre Verbände organisieren, können sie die Komplexität und Funktion von Organen besser nachbilden. Die Etablierung eines effizienten und reproduzierbaren Protokolls ermöglichte es, zunächst selbstorganisierte 3D-Kulturen aus murinen Brustfettpolstern abzuleiten. Die so gewonnenen Mamma-Organoide zeigten eine für Brustdrüsen typische Kompartimentierung und setzten sich aus unterschiedlichen, für das Ursprungsgewebe charakteristischen Epithelzell-*Lineages* zusammen. Unter Verwendung von Mamma-Epithelzellen des CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup>-Mausmodells wurden anschließend 3D-Kulturen (p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>) generiert, die eine konditionale Aktivierung neoplastischer Treibermutationen erlaubten. Nach genetischer Modifikation wurden dadurch Organoide (ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>) mit relevanten Mutationen und Signaltransduktionskaskaden des ErbB2-positiven Mammakarzinoms gewonnen. ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen wiesen zahlreiche Eigenschaften auf, die mit einer malignen Transformation einhergehen, darunter eine veränderte Zellmorphologie, eine gesteigerte Proliferation sowie Anzeichen einer autonomen Reproduktion und einer genomischen Instabilität.

In nachfolgenden Analysen vermittelte die Interaktion mit dissoziierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden eine spezifische Degranulation der NK-92/5.28.z Zellen. Die CAR-vermittelte Aktivierung der Effektorzellen konnte dabei durch eine gerichtete Polarisierung der zytolytischen Granula in NK-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin zeigte sich, dass dissoziierte ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide in 2D-Kultur effizient durch ErbB2-spezifische CAR-NK-Zellen abgetötet wurden. Nach Etablierung eines Luciferase-basierten Reporterassays und einer mikroskopischen Zeitrafferuntersuchung wurde die Anti-Tumor-Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen anschließend gegen 3D-Kulturen untersucht. Im Vergleich zu dissoziierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen wurde dabei eine geringere Lyse durch NK-92/5.28.z Zellen festgestellt. Diese Unterschiede ließen sich auf die komplexere Architektur der Organoide zurückführen, was auf eine im Vergleich zu herkömmlichen 2D-Kulturen verbesserte pathophysiologische Nachbildung solider Tumoren hindeutet. In Langzeit-Zytotoxizitätsstudien von 12 h konnte bei optimierten Ko-Kultivierungsbedingungen die Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen gegen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide gesteigert werden. Wie bei soliden Krebserkrankungen, in welchen NK-Zellen vor allem in perivaskulären Bereichen und Randregionen des Tumors gefunden werden, konnte auch bei Organoid-Ko-Kulturen keine offensichtliche NK-Zell-Infiltration in die Tiefe der gewebeähnlichen Strukturen beobachtet werden. Die Lyse von Tumorzellen erfolgte stattdessen ausgehend von peripheren

Bereichen der Organoide. Dabei wurde ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Gesamtlyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide durch NK-92/5.28.z Zellen und der Organoid-Fläche festgestellt. Weiterhin zeigte sich, dass die CAR-vermittelte Lyse bei 24-stündigen Ko-Kulturen durch natürliche Zytotoxizitätsmechanismen komplementiert wurde, was sich in einer ErbB2-unabhängigen Abtötung der Zielzellen widerspiegelte. In den hier durchgeführten *in vitro* Versuchen erwiesen sich die etablierten Organoide als innovatives Modellsystem, das sich gegenüber klassischen 2D-Kulturen durch eine höhere Komplexität auszeichnete und in dem wichtige Erkenntnisse zur Lyseaktivität und Migrationsfähigkeit der CAR-NK-Zellen gewonnen werden konnten.

Abschließend wurde das *Engraftment* der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide in Mäusen untersucht. In immundefizienten Tieren konnte die Tumorigenität der modifizierten Mamma-Epithelzellen bestätigt werden. Seriell *in vivo* Passagieren in NSG-Mäusen förderte die Tumorprogression der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen weiter. Dabei entwickelten sich Organoid-Derivate, die einen einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) entsprechenden und tumorstammzellähnlichen Phänotyp aufwiesen. Die EMT ist ein ausschlaggebender Prozess bei der Entstehung von Metastasen. Da Tumorzellen mit solchen Eigenschaften häufig eine erhöhte Resistenz gegen konventionelle und immuntherapeutische Behandlungsansätze aufweisen, wurde in nachfolgenden *in vitro* Untersuchungen die Sensitivität der verschiedenen Organoid-Derivate gegenüber CAR-NK-Zellen untersucht. Dabei wurde eine vergleichbare Lyse der Ausgangslinie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> und der durch *in vivo* Passagieren abgeleiteten Tumor-Organoide mit EMT-Phänotyp festgestellt. Dies unterstreicht den möglichen Nutzen der NK-92/5.28.z Zellen als experimenteller Therapieansatz bei bereits metastasiertem Brustkrebs. Um neben der direkten Lyse von Tumorzellen auch den möglichen immunmodulatorischen Einfluss der NK-Zellen auf das endogene Immunsystem zu untersuchen, sollte eine abschließende Evaluierung der CAR-NK-Zelltherapie in immunkompetenten Mäusen erfolgen. Als Voraussetzung für die Etablierung eines immunkompetenten *in vivo* Modells des ErbB2-positiven Mammakarzinoms wurde das *Engraftment* der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen und *in vivo* passagierten Organoid-Derivate in C57BL/6-Mäusen untersucht. Bei der subkutanen Transplantation der Organoide wurde in immunkompetenten Tieren nach einem anfänglichen Anwachsen jedoch eine spontane Abstoßung der Tumorzellen beobachtet. Nachfolgende Experimente sollten daher darauf abzielen, die Transplantationsbedingungen zu optimieren, um so ein für Therapieversuche geeignetes immunkompetentes Mausmodell des ErbB2-positiven Mammakarzinoms zu etablieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit veranschaulichen das vielversprechende Potenzial einer CAR-NK-Zell-basierten Immuntherapie für das ErbB2-positive Mammakarzinom in einem klinisch relevanten *in vitro* Modell und zeigen damit, dass Organoide einen wichtigen Beitrag in der translationalen Forschung leisten können.

# Inhaltsverzeichnis

<i>Eidesstattliche Versicherung</i> .....	<i>I</i>
<i>Zusammenfassung</i> .....	<i>II</i>
<i>Inhaltsverzeichnis</i> .....	<i>V</i>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Die Entstehung von Krebserkrankungen (Karzinogenese) .....	1
1.1.1 Immunüberwachung und Immuneditierung von Tumoren.....	2
1.2 Natürliche Killerzellen .....	6
1.2.1 Regulation der NK-Zell-Aktivität durch inhibierende und aktivierende Rezeptoren.....	7
1.2.2 Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität.....	9
1.3 Zelluläre Immuntherapien für die Behandlung von Krebserkrankungen .....	12
1.3.1 Chimäre Antigenrezeptoren (CARs) .....	13
1.3.2 NK-Zellen in der Immuntherapie.....	17
1.3.3 Die NK-Zelllinie NK-92 .....	19
1.3.4 Die ErbB2-spezifische CAR-NK-Zelllinie NK-92/5.28.z .....	20
1.4 Das Mammakarzinom .....	21
1.4.1 Pathologie und immunhistologische Subklassifizierung des Mammakarzinoms .....	22
1.4.2 Das HER2 (ErbB2)-positive Mammakarzinom .....	23
1.4.3 Präklinische Modellsysteme des (ErbB2-positiven) Mammakarzinoms .....	25
1.5 Ziel dieser Arbeit .....	28
<b>2. Material</b> .....	<b>30</b>
2.1 Laborgeräte und Apparaturen.....	30
2.2 Chemikalien und Reagenzien .....	31
2.3 Puffer und Lösungen.....	33
2.4 Verbrauchsmaterial .....	33
2.5 Molekulargewichtsstandards und Ladepuffer.....	34
2.6 Enzyme .....	34
2.7 Antikörper .....	35
2.8 Kits .....	37
2.9 Plasmide.....	38
2.10 Oligonukleotide .....	38
2.11 Bakterienmedien und Antibiotika.....	39
2.12 Bakterienstämme .....	40
2.13 Zellkulturmedien, Zusätze und rekombinante Proteine.....	40
2.14 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen .....	41

2.15 Mausstämme.....	44
2.16 Software.....	44
<b>3. Methoden .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.1.1 Isolation von DNA.....	45
3.1.1.1 Gewebe und Zellsuspensionen.....	45
3.1.1.2 Bakterien.....	45
3.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion .....	46
3.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	47
3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA .....	47
3.1.4.1 Analytische Gelelektrophorese.....	47
3.1.4.2 Präparative Gelelektrophorese.....	47
3.1.5 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA.....	48
3.1.6 Ligation von DNA-Molekülen.....	48
3.1.7 Erzeugung rekombinanter Plasmid-DNA mittels <i>Gibson Assembly</i> .....	49
3.1.8 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien.....	49
3.1.9 Transformation von <i>E coli</i> mit rekombinanter DNA.....	50
3.1.10 Sequenzierung von DNA.....	50
<b>3.2 Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>51</b>
3.2.1 Herstellung von Zelllysaten.....	51
3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	51
3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	52
3.2.4 Immunoblot-Analyse (Western blot) .....	53
<b>3.3 Zellkulturmethoden .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Kultivierung und Passagieren von Säugetierzellen in 2D-Kulturen .....	54
3.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Säugetierzellen in 2D-Kulturen .....	54
3.3.3 Kultivierung von Säugetierzellen in 3D-Kulturen.....	54
3.3.3.1 Etablierung von Organoiden des Brustepithels .....	55
3.3.3.2 Passagieren von Organoiden des Brustepithels .....	56
3.3.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Organoiden des Brustepithels .....	57
3.3.4 Bestimmung der Zellzahl .....	57
3.3.5 Genetische Modifikation von Säugetierzellen.....	58
3.3.5.1 Transfektion zur Erzeugung genetisch modifizierter Zelllinien.....	58
3.3.5.2 Lentivirale Transduktion.....	58
3.3.6 <i>Killing Curve</i> .....	60
<b>3.4 Durchflusszytometrische Analyse.....</b>	<b>60</b>
3.4.1 Bestimmung der Transfektions- und Transduktionseffizienz .....	61
3.4.2 Titration von Antikörpern .....	62
3.4.3 Detektion von Oberflächenantigenen.....	62
3.4.4 Kompensation von Mehrfarbenfluoreszenzanalysen .....	63
3.4.5 FACS-basierte Lebend-Tot-Diskriminierung.....	64
3.4.6 Fluoreszenz-basierte Zellanreicherung.....	64
3.4.7 Intrazelluläre Färbung.....	64
3.4.8 Zellzyklusanalyse .....	65
3.4.9 Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase mittels Fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranosid (FDG).....	66
3.4.10 Durchflusszytometer-basierter Degranulationsassay .....	66
3.4.11 Durchflusszytometer-basierter Zytotoxizitätsassay .....	67
<b>3.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie .....</b>	<b>68</b>
3.5.1 Detektion fluoreszierender Proben.....	69

3.5.1.1 Anziehen zweidimensionaler Zellkulturen für mikroskopische Analysen .....	69
3.5.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von Organoiden .....	70
3.5.1.3 Detektion von Oberflächenantigenen .....	70
3.5.1.4 Detektion von intrazellulären Antigenen und Kernfärbung .....	71
3.5.1.5 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen .....	71
3.5.2 <i>Time-Lapse-Imaging</i> (Zeitraffer-Bildgebung).....	72
3.5.2.1 Mikroskopischer Degranulationassay.....	72
3.5.2.2 Zytotoxizitätsassay mit Caspase-Sonde.....	73
<b>3.6 Mikrotiterplatten-Assays.....</b>	<b>73</b>
3.6.1 Kristallviolett-Färbung.....	73
3.6.2 Luciferase-Reporterassay .....	74
3.6.3 $\beta$ -Galaktosidase Reporterassay .....	75
<b>3.7 Immunhistochemie und histochemische Färbungen.....</b>	<b>75</b>
3.7.1 Immunhistochemie an Organoiden .....	75
3.7.2 Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung.....	76
3.7.3 X-Gal-Färbung.....	76
3.7.4 <i>Carmine Alum</i> -Färbung.....	77
<b>3.8 Tierversuche.....</b>	<b>77</b>
3.8.1 Haltung von Mäusen .....	77
3.8.2 Zucht der genetisch veränderten Mauslinie CKP .....	77
3.8.3 Subkutane Transplantation von Organoiden.....	78
<b>3.9 Statistische Analysen .....</b>	<b>78</b>
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>79</b>
<b>4.1 Etablierung von murinen Mamma-Organoiden .....</b>	<b>80</b>
4.1.1 Anatomie und zelluläre Zusammensetzung des murines Brustdrüsenepithels .....	80
4.1.2 Anreicherung muriner Brustepithelzellen in 3D-Kulturen .....	83
4.1.3 Architektur und zelluläre Heterogenität muriner Mamma-Organoiden.....	86
4.1.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 bis 4.1.3.....	90
<b>4.2 Ableitung und Charakterisierung genetisch modifizierter Mamma-Organoiden .....</b>	<b>91</b>
4.2.1 Genetische Modifikation zur neoplastischen Transformation von Mamma-Organoiden .....	91
4.2.2 Ableitung und Validierung lentiviraler Viruspartikel mit ecotropem Wirtsspektrum .....	92
4.2.3 Validierung genetischer Treibermutationen in modifizierten Mamma-Organoiden .....	95
4.2.4 Morphologische und molekulare Veränderungen in modifizierten Mamma-Organoiden.....	101
4.2.5 Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1-4.2.4 .....	106
<b>4.3 Aktivität ErbB2-spezifischer CAR-NK-Zellen gegen Antigen-positive Mamma-Organoiden .....</b>	<b>107</b>
4.3.1 Generierung und funktionale Charakterisierung Reporter-exprimierender Mamma-Organoiden	107
4.3.2 CAR-NK-Zell-Aktivität gegen dissoziierte Mamma-Organoiden.....	108
4.3.3 CAR-NK-Zell-Aktivität gegen 3D-Kulturen .....	113
4.3.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.3.1 – 4.3.3 .....	127
<b>4.4 Plastizität aus Mamma-Organoiden generierter Tumoren .....</b>	<b>128</b>
4.4.1 <i>Engraftment</i> und seriell Passagieren muriner Mamma-Organoiden .....	128
4.4.2 Plastizität <i>in vivo</i> passagierter Mamma-Organoiden.....	129
4.4.3 Aktivität von CAR-NK-Zellen gegen <i>in vivo</i> passagierte Mamma-Organoiden .....	135
4.4.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1-4.4.3 .....	138
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>140</b>
<b>5.1 Etablierung und Charakterisierung von Organoiden des murinen Brustepithels .....</b>	<b>141</b>



5.1.1 Etablierung von murinen Mamma-Organoiden .....	142
5.1.2 Kompartimentierung und zelluläre Zusammensetzung der Mamma-Organoiden .....	145
<b>5.2 Etablierung von Mamma-Organoiden mit neoplastischen Treibermutationen .....</b>	<b>147</b>
5.2.1 Genetische Modifikation von p53 <sup>fl/fl</sup> /LSL-Kras <sup>G12V</sup> -Organoiden des Brustepithels .....	147
5.2.2 Phänotypische und molekulare Charakterisierung genetisch modifizierter Mamma-Organoiden .....	150
<b>5.3 Analyse der Aktivität von CAR-NK-Zellen im ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoid-Modell des Mammakarzinoms.....</b>	<b>153</b>
5.3.1 Etablierung von Zytotoxizitätsassays zur Untersuchung der NK-Zell-vermittelten Lyse von 3D-Kulturen .....	154
5.3.2 NK-Zell-Aktivität gegen dissoziierte Mamma-Organoiden.....	155
5.3.3 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen intakte Mamma-Organoiden in 3D-Kultur .....	157
<b>5.4. <i>In vivo</i> Engraftment und Plastizität der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden.....</b>	<b>161</b>
5.4.1 <i>Engraftment</i> und Tumorprogression <i>in vivo</i> passagierter Organoiden nach Transplantation in immundefiziente Mäuse .....	161
5.4.2 <i>Engraftment in vivo</i> passagierter Organoiden in immunkompetenten Mäusen .....	164
5.4.3 <i>In vitro</i> Anti-Tumoraktivität von CAR-NK-Zellen gegen <i>in vivo</i> passagierete Organoiden mit heterogenem Phänotyp .....	165
<b>5.5 Ausblick.....</b>	<b>167</b>
<b>6. Anhang .....</b>	<b>169</b>
<b>7. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>173</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>196</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>198</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>199</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>201</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>203</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>204</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Die Entstehung von Krebserkrankungen (Karzinogenese)

Der Begriff Krebs beschreibt eine Vielzahl an Erkrankungen, bei denen körpereigene Zellen als Folge einer neoplastischen Transformation unkontrolliertes Zellwachstum aufweisen. Dabei zeichnen sich maligne Krebserkrankungen durch infiltrativ-destruktives Wachstum in umliegenden Geweben und die Fähigkeit der Metastasierung aus. Weltweit gehören Krebserkrankungen zu den zweithäufigsten Todesursachen und allein im Jahr 2018 starben nach Schätzungen der Weltgesundheitsorganisationen etwa 9,6 Millionen Menschen an Krebs (World Health Organization, 2022).

Gesunde Zellen besitzen zahlreiche Mechanismen, um die Homöostase zwischen Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose zu gewährleisten. Für die Entstehung von Krebs sind daher multifaktorielle Prozesse notwendig, die dazu führen, dass entartete Zellen intrinsische Kontrollmechanismen überwinden und infolgedessen eine aberrante Proliferation und gestörte Apoptose aufweisen (Evan & Vousden, 2001; Fernald & Kurokawa, 2013; Vogelstein *et al*, 2013). Dies wird vor allem durch Mutationen in sogenannten Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen begünstigt (Weinberg, 1994). Proto-Onkogene, deren Expression unter physiologischen Bedingungen strengen Regulationsmechanismen unterliegt, fördern die Zellteilung und das Zellwachstum und können gleichzeitig der Differenzierung und Apoptose entgegenwirken. Der Übergang in transformierende Onkogene wird durch *Gain-of-Function*-Mutationen verursacht, die eine konstitutive Aktivierung und/oder Überexpression bedingen und somit wachstumspromovierende Eigenschaften verleihen (Adamson, 1987; Weinstein & Joe, 2006). Die Genprodukte von Tumorsuppressorgenen sind in DNA-Reparaturprozessen, der Überwachung und Progression des Zellzyklus sowie der Regulation und Einleitung der Apoptose involviert. Ein Funktionsverlust dieser Gene kann zur unkontrollierten Zellteilung beitragen und somit die Entstehung und Progression von Tumoren begünstigen (Weinberg, 1994). Die maligne Transformation von Zellen ist allerdings nicht auf ein einzelnes Ereignis zurückzuführen, sondern das Ergebnis einer sukzessiven Anhäufung von chromosomalen Aberrationen, somatischen Mutationen sowie epigenetischen Veränderungen (Jones & Baylin, 2002; Vogelstein & Kinzler, 1993). Diese werden dem Mehrstufenmodell der Karzinogenese zufolge in den drei Phasen der Initiation, Promotion und Progression akquiriert. Karzinogene, aber auch Spontanmutationen verursachen irreversible somatische Veränderungen im Erbgut, welche sich in der Entstehung präneoplastischer Zellen manifestieren (Initiation). Im zweiten Schritt, dem anfänglich noch reversiblen Prozess der Promotion, führt die wiederholte Exposition nicht-mutagener, tumorpromovierender Faktoren (Promotoren) zur klonalen Expansion der präneoplastischen Zellen. Die Genese von malignen

Tumoren im Zuge der Progression erfordert weitere genetische Veränderungen, die in betroffenen Zellen eine zunehmende Entdifferenzierung und eine unkontrollierte Zellteilung bewirken (Pitot, 1993). Entartete Tumorzellen zeichnen sich dabei durch gemeinsame, zellphysiologische Eigenschaften aus, die als *Hallmarks of Cancer* zusammengefasst wurden (Hanahan & Weinberg, 2011; Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2000). Diese beinhalten beispielsweise die reproduktive Autonomie und anhaltende Fähigkeit zur Zellteilung (Immortalität), den Sensitivitätsverlust gegenüber Signalen der Wachstumsinhibition und Apoptose, die Induktion einer anhaltenden tumorpromovierenden Inflammation und Neoangiogenese, die phänotypische Plastizität und Fähigkeit zur Gewebeinvasion und Metastasierung sowie die Fähigkeit, sich der Überwachung durch das Immunsystem zu entziehen (Immunevasion).

### 1.1.1 Immunüberwachung und Immuneditierung von Tumoren

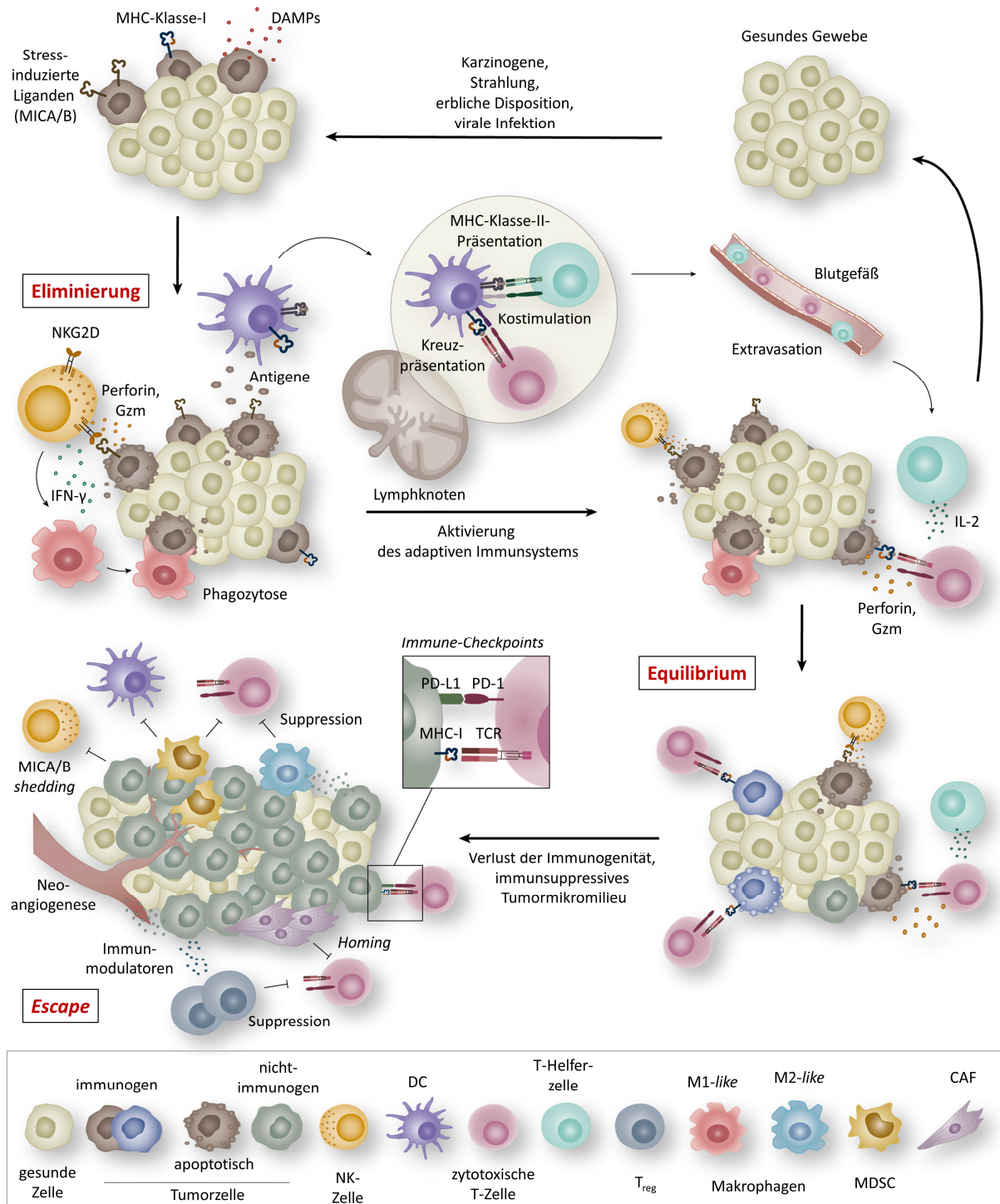
Bereits 1909 prägte Paul Ehrlich die Idee einer Tumorummunität, welche durch die Forscher Burnet und Thomas zur Theorie der *Immunosurveillance* erweitert wurde (Burnet, 1957; Ehrlich, 1909; Thomas, 1982). Diese postuliert, dass sich Tumorzellen durch veränderte Oberflächenstrukturen von gesunden Zellen unterscheiden und dadurch eine gerichtete Erkennung und Eliminierung durch das Immunsystem erfolgen kann. Heutzutage ist bekannt, dass Tumorzellen beispielsweise eine gesteigerte Expression von Stress-induzierten NKG2D-Liganden aufweisen und dadurch von Effektorzellen des Immunsystems erkannt und abgetötet werden. Eine wichtige Rolle bei der Induktion einer effizienten Tumorummunität spielen außerdem tumorspezifische Antigene (TSA, auch als Neoantigene bezeichnet,) und tumorassoziierte Antigene (TAA) (Ilyas & Yang, 2015). Als Produkt mutierter Gene oder einer viralen Infektion ist die Expression von Neoantigenen auf Tumorzellen beschränkt. Im Gegensatz dazu können TAAs auch in gesundem Gewebe exprimiert werden, unterscheiden sich allerdings durch eine zumeist stark erhöhte oder fehlregulierte Expression im Tumorgewebe. Tumorantigene werden nach intrazellulärer Prozessierung als Peptidfragmente auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert und können von zytotoxischen T-Zellen als zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems erkannt werden (Comber & Philip, 2014). Demnach nimmt das Immunsystem, wie durch Burnet und Thomas postuliert, eine zentrale Rolle in der Immunüberwachung ein. Die experimentelle Validierung dieser Theorie erfolgte jedoch erst Ende des 20. Jahrhunderts und erforderte zunächst die Etablierung immundefizienter Mausmodelle und die Entwicklung von Antikörpern zur selektiven Depletion einzelner Komponenten des Immunsystems (Dunn *et al*, 2004, 2002). Dadurch konnte die Tumorummunität auf komplexe Wechselwirkungen zwischen Zellen und löslichen Faktoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems zurückgeführt werden (Dunn *et al*, 2004). Weitere Erkenntnisse, wie die Immunogenität von chemisch induzierten Tumoren, die in Mäusen mit Immundefekten gegenüber immunkompetenten Tieren erhöht ist, führten zur erweiterten Theorie des *Immunoediting* (Dunn *et al*, 2002). Diese

berücksichtigt, dass Tumorzellen unter anhaltendem Selektionsdruck durch das Immunsystem Resistenzmechanismen anreichern, die eine Immuntoleranz induzieren können. Mit Hilfe der *Immunoediting*-Theorie kann der Einfluss des Immunsystems bei der Entstehung von Krebs durch die drei aufeinanderfolgenden Phasen Eliminierung, Equilibrium und Tumor-*Escape* erklärt werden (siehe Abb. 1.1). Dabei entspricht die Eliminierungsphase dem ursprünglichen Konzept der *Immunosurveillance*-Theorie, die beschreibt, dass Tumorzellen vom Immunsystem erkannt und abgetötet werden. Während der Eliminierungsphase verursachen invasiv wachsende Tumorzellen lokale Gewebeschäden, wodurch pro-inflammatorische Zytokine, Chemokine sowie *Damage-associated molecular patterns* (DAMPs) freigesetzt werden und zur Rekrutierung von Immunzellen beitragen (Garg *et al*, 2013). Zellen des angeborenen Immunsystems, darunter natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen, wandern in das inflammatorische Gewebe ein.

Als erste Verteidigungslinie besitzen NK-Zellen verschiedene Mechanismen, um entartete Zellen zu eliminieren. Beispielsweise können transformierte Zellen durch die Expression von Stressliganden über den aktivierenden NKG2D-Rezeptor von NK-Zellen erkannt werden (Guerra *et al*, 2008). Nach der Aktivierung vermitteln NK-Zellen durch die gerichtete Ausschüttung von Effektormolekülen wie Perforin und Granzyme nicht nur die Lyse von Tumorzellen, sondern sekretieren auch pro-inflammatorische Zytokine wie beispielsweise Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Neben anti-proliferativen und apoptotischen Effekten, fördert IFN- $\gamma$  unter anderem die Antigenpräsentation und steigert dadurch die Immunogenität der entarteten Zellen (Dunn *et al*, 2006). Weiterhin besitzt IFN- $\gamma$  immunmodulatorische Eigenschaften und kann zusammen mit DAMPs die Polarisierung infiltrierender Makrophagen zu einem pro-inflammatorischen Phänotyp (*M1-like*) begünstigen (Mosser *et al*, 2021). Diese töten und phagozytieren entartete Zellen und fördern die Entzündungsreaktion durch die Freisetzung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine. Das im Tumor vorherrschende Zytokin-Milieu, aber auch die Kommunikation mit NK-Zellen begünstigt die Reifung von dendritischen Zellen (engl., *Dendritic cells*, DCs). Als professionelle antigenpräsentierende Zellen (engl., *Antigen-presenting cells*, APCs) können DCs im Gewebe vorgefundene Zelltrümmer über Endozytose bzw. Phagozytose aufnehmen und eine Antigen-spezifische Immunantwort auslösen (*Priming*) (Sallusto & Lanzavecchia, 2002). Dafür wandern DCs in abführende Lymphknoten, in welchen sie Antigene über MHC-Klasse-II für T-Helferzellen präsentieren und weiterhin eine MHC-Klasse-I-vermittelte Kreuzpräsentation für zytotoxische T-Zellen ermöglichen. Zur vollständigen Aktivierung benötigen T-Zellen ein zweites Signal, welches nach Bindung an kostimulatorische Rezeptoren ausgelöst wird (Chen & Flies, 2013). Aktivierte T-Zellen können nachfolgend über Blutgefäße in das Tumorgewebe infiltrieren (*Homing*). Über die Sekretion von Zytokinen wie IL-2 sowie direkte Effektorfunktionen vermitteln T-Helferzellen und zytotoxische T-Zellen eine tumorspezifische Immunantwort und können so grundsätzlich zusammen mit dem angeborenen

Immunsystem den Organismus vollständig von entarteten Zellen befreien (Ostroumov *et al*, 2018). Ist das Immunsystem allerdings nicht in der Lage, alle Tumorzellen zu beseitigen, tritt die Krebserkrankung in die Phase des Equilibriums über, in welcher die Ausbreitung entarteter Zellen vor allem noch durch das adaptive Immunsystem verhindert wird. In einem dynamischen Gleichgewicht zwischen Immunabwehr und Tumorwachstum können maligne Zellen so über einen langen Zeitraum ohne klinische Manifestation bestehen. Der Selektionsdruck der fortwährenden Immunabwehr kann allerdings auch zu einer physiologischen Anpassung der Tumorzellen beitragen. Entstehen dabei immunresistente Zellvarianten, die sich durch geeignete Evasionsmechanismen einer Erkennung durch das Immunsystem entziehen, beginnt die *Escape*-Phase, in welcher Tumorzellen ungehemmt proliferieren und der Tumor klinisch sichtbar wird (Dunn *et al*, 2004, 2002).

Die Immunevasion kann auf zahlreiche Defensivstrategien zurückgeführt werden, die entweder von Tumorzellen selbst induziert oder durch ein immunsuppressives Tumormikromilieu begünstigt werden. Zu den zellautonomen Strategien zählen beispielsweise die aberrante MHC-Klasse-I Expression oder Antigen-Prozessierung und die Herabregulation immunogener Epitope, wodurch Tumorzellen einen Antigenitätsverlust erlangen (Vinay *et al*, 2015). Weiterhin können sich Tumoren durch proteolytisches *Shedding* der Stress-induzierten Liganden MICA/B einer NKG2D-vermittelten Lyse durch NK-Zellen entziehen und weisen somit eine verminderte Immunogenität auf (Duan *et al*, 2019). Durch die Expression inhibitorischer *Immune-Checkpoint*-Liganden wie beispielsweise *Programmed cell death-ligand 1* (PD-L1) können Tumorzellen außerdem die Aktivität von Immuneffektorzellen beeinflussen und zu einem dysfunktionalen und erschöpften Phänotyp beitragen (Zhang *et al*, 2020). Ein weiterer Mechanismus der Immunevasion ist die Sekretion löslicher Immunmodulatoren, darunter Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, welche umliegende Immunzellen und das Tumorstroma beeinflussen. Dies trägt zu einer aktiven Suppression von Effektorzellen bei, resultiert in einer verminderten Infiltration von Immunzellen und fördert die Neoangiogenese (Vinay *et al*, 2015). Darüber hinaus wird die Rekrutierung und Reifung immunsuppressiver Zellpopulationen, wie beispielsweise *Cancer-associated fibroblasts* (CAFs), *Myeloid-derived suppressor cells* (MDSCs), regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) und anti-inflammatorischer (*M2-like*) Makrophagen gefördert. Diese bilden nicht nur eine physikalische Barriere, sondern tragen über einen direkten Zell-Zell-Kontakt oder die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine zu einem immunsuppressiven Tumormikromilieu bei, wodurch die Immuntoleranz und Tumorprogression weiter gefördert wird (Hatzioannou *et al*, 2017; Labani-Motlagh *et al*, 2020; Mantovani *et al*, 2002).



**Abb. 1.1 Immunoeediting.** Gesunde Zellen transformieren bedingt durch endogene und exogene Faktoren in neoplastische Tumorzellen, welche sich durch phänotypische und physiologische Veränderungen von gesundem Gewebe unterscheiden. Während der Eliminierung werden diese entarteten Zellen durch zelluläre und lösliche Faktoren des angeborenen Immunsystems bekämpft. Gleichzeitig werden von lysierten Tumorzellen freiwerdende Antigene von antigenpräsentierenden Zellen (APCs) wie beispielsweise dendritischen Zellen (DCs) aufgenommen, prozessiert und in den abführenden Lymphknoten gegenüber T-Zellen präsentiert. Aktivierte T-Zellen wandern in den Tumor und tragen dort zu einer effektiven Anti-Tumor-Aktivität bei. Es entsteht ein dynamisches Gleichgewicht (Equilibrium), in welchem entartete Zellen proliferieren, eine Ausbreitung des Tumors jedoch durch Zellen des Immunsystems noch verhindert wird. Die selektive Einflussnahme des Immunsystems kann jedoch auch die Entstehung von Tumorzellen fördern, die sich nachfolgend einer Überwachung und/oder Bekämpfung durch das Immunsystem entziehen können (*Escape*). Weitere Erläuterungen im Text.

## 1.2 Natürliche Killerzellen

Die erstmalige Beschreibung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) erfolgte 1975 als eine bis dahin unbekannte Lymphozyten-Population mit der Fähigkeit, Tumorzellen ohne vorherige Sensibilisierung zu lysieren (Herberman *et al*, 1975; Kiessling *et al*, 1975). Heutzutage ist bekannt, dass NK-Zellen eine zentrale Rolle in der Bekämpfung physisch gestresster oder Virus-infizierter Zellen einnehmen (Hauser *et al*, 1983; Laskay *et al*, 1993; Cerwenka & Lanier, 2001; Chan *et al*, 2014). Wie B- und T-Zellen gehen NK-Zellen aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle hervor, werden aufgrund ihrer nicht von Antigenen abhängigen Aktivierung allerdings dem angeborenen Immunsystem zugerechnet (Abel *et al*, 2018). Natürliche Killerzellen entstehen im Knochenmark und sind nachfolgend in lymphatischen und nicht-lymphatischen Geweben vorzufinden. Der prozentuale Anteil von NK-Zellen im peripheren Blut entspricht etwa 5-20 % der zirkulierenden Lymphozyten (Abel *et al*, 2018; Vivier *et al*, 2008). Humane NK-Zellen können durch die Expression des Zelladhäsionsmoleküls CD56 bei gleichzeitiger Abwesenheit des CD3-Rezeptors identifiziert werden. In Abhängigkeit von ihrem CD56-Expressionsniveau und der Expression des Fc $\gamma$ -Rezeptors CD16 lassen sich NK-Zellen weiter in die Subpopulationen CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>high</sup> und CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/neg</sup> einteilen, welche sich hinsichtlich Funktion, prozentualer Verteilung und Lokalisation unterscheiden (Lanier *et al*, 1986). Mit etwa 90 % zeichnet sich die Mehrheit der NK-Zellen des peripheren Bluts durch eine geringe CD56- und hohe CD16-Expression aus (Cooper *et al*, 2001a). Durch die stärkere Expression von Effektormolekülen und eine effektivere Konjugatbildung mit Zielzellen, weisen CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>high</sup>-NK-Zellen ein erhöhtes zytolytisches Potenzial auf. Zudem sind sie durch eine gesteigerte Expression der inhibierenden Killerzell-Immunglobulin-ähnlichen Rezeptoren (KIRs) gekennzeichnet (Jacobs *et al*, 2001), welche wie nachfolgend beschrieben zum Aktivierungsstatus der NK-Zellen beitragen. CD56<sup>dim</sup>CD16<sup>high</sup>-NK-Zellen besitzen außerdem eine Vielzahl verschiedener Chemokin-Rezeptoren, die sie in inflammatorische Gewebe migrieren lassen (Castriconi *et al*, 2018; Cooper *et al*, 2001a; Stabile *et al*, 2017; Vivier *et al*, 2008). Im Gegensatz dazu sind NK-Zellen des CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/neg</sup>-Phänotyps vor allem in Lymphknoten, den Mandeln und der Milz vorzufinden (Vivier *et al*, 2008). Da CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>low/neg</sup>-NK-Zellen nach der Aktivierung eine gesteigerte Zytokin-Sekretion aufweisen, werden dieser Subpopulation immunregulatorische Eigenschaften zugesprochen (Biron *et al*, 1999; Cooper *et al*, 2001b; Poli *et al*, 2009). Dabei tragen sie zur Modulation der Hämatopoese bei, können eine Entzündungsreaktion induzieren und üben durch die Kommunikation mit dendritischen Zellen und Makrophagen auch indirekte regulatorische Effekte auf das adaptive Immunsystem aus (Moretta, 2005; Michel *et al*, 2013; Zhang *et al*, 2017; Biron *et al*, 1999; Wu *et al*, 2017).

Die Fähigkeit, eine schnelle und nicht von der Erkennung spezifischer Antigene abhängige Immunabwehr gegen entartete körpereigene Zellen auszulösen verschafft NK-Zellen zunehmende



Aufmerksamkeit als vielversprechende Effektorzellen für die Entwicklung neuartiger immuntherapeutischer Behandlungsstrategien (Vivier *et al*, 2008; Zingoni *et al*, 2010).

### 1.2.1 Regulation der NK-Zell-Aktivität durch inhibierende und aktivierende Rezeptoren

Natürliche Killerzellen besitzen die Fähigkeit, entartete und gestresste Zellen zu erkennen und diese von körpereigenen, gesunden Zellen zu unterscheiden. Komplexe Mechanismen regulieren dabei die zytotoxische Aktivität gegen Zielzellen und vermeiden gleichzeitig Gewebeschäden durch die Lyse gesunder Körperzellen. Entscheidend für den Aktivierungszustand von NK-Zellen ist das Zusammenspiel Keimbahn-kodierter Rezeptoren, welche durch die Interaktion mit Liganden der Zielzellen aktivierende und inhibierende Signale integrieren (Cerwenka & Lanier, 2001; Lanier, 2005; Raulet *et al*, 2001). Nur bei kontinuierlicher und dominierender Signaltransduktion durch aktivierende Rezeptoren wird eine von der NK-Zelle gebundene Zielzelle lysiert (Kruse *et al*, 2014; Long *et al*, 2013; Watzl, 2014). Überwiegen hingegen die inhibierenden Signale, wird eine Selbsttoleranz erzeugt und der Kontakt zur Zielzelle folglich gelöst. Die funktionelle Reifung der NK-Zellen wird durch einen Mechanismus, der als *Education* oder *Licensing* bezeichnet wird, ausgelöst. Demnach erlangen NK-Zellen erst nach der Interaktion von inhibierenden Rezeptoren mit körpereigenen Selbst-Antigenen wie MHC-Klasse-I die Kompetenz, ihre vollständigen Effektorfunktionen auszuüben (Kim *et al*, 2005). Gleichzeitig besteht bei NK-Zellen ohne inhibierende Rezeptoren zur Erkennung eigener MHC-Klasse-I-Moleküle ein Zustand, der durch Hyporeaktivität gekennzeichnet ist und damit eine Autoreaktivität verhindert (Jaeger und Vivier, 2012; Raulet & Vance, 2006). Lizenzierte NK-Zellen weisen folglich eine durch den *Education*-Prozess weiter modulierte Anzahl und Diversität an aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren auf (Raulet *et al*, 2001).

Die wichtigsten Rezeptoren humaner NK-Zellen, die der Erkennung und Unterscheidung von Zielzellen dienen, können in vier verschiedene Familien eingeteilt werden. Diese umfassen Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (KIR), Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren (LIR/ILT), Killerzell-Lektin-ähnliche-Rezeptoren (KLR) sowie die natürlichen Zytotoxizitätsrezeptoren (engl., *Natural cytotoxicity receptor*, NCR) (Finton & Strong, 2012). Die polymorphen Mitglieder der KIR-Familie dienen hauptsächlich der Erkennung gesunder, körpereigener Zellen und spielen somit eine wichtige Rolle bei der Regulierung der NK-Zell-Aktivität entsprechend der nachfolgend beschriebenen *Missing-self*-Hypothese sowie bei der Erzeugung einer Selbsttoleranz im Zuge der NK-Zell-*Education* (Finton & Strong, 2012). KIRs umfassen sowohl aktivierende als auch inhibierende Rezeptoren, welche sich in der Länge der zytoplasmatischen Domäne und der Art der Signaltransduktion unterscheiden (Pende *et al*, 2019). Von insgesamt 15 unterschiedlichen KIRs exprimiert jede NK-Zelle ihr individuelles Rezeptor-Repertoire, das bei lizenzierten NK-Zellen mindestens einen inhibierenden KIR umfasst (Moretta, 2004;



Valiante *et al*, 1997). Inhibierende KIR-Rezeptoren besitzen eine lange zytoplasmatische Domäne und binden überwiegend an die humanen Leukozytenantigene HLA-A, HLA-B und HLA-C, welche von gesunden, kernhaltigen Zellen exprimiert werden und zur Inhibition der NK-Zell-Aktivität beitragen (Paul & Lal, 2017). Auch Oberflächenmoleküle der LIR-Familie beinhalten aktivierende und inhibierende Rezeptoren, von welchen einzelne Mitglieder nicht nur mit klassischen, sondern auch mit nicht-klassischen MHC-Molekülen interagieren können. Nicht-klassische HLA-E-Moleküle können außerdem durch einige Vertreter der Killerzellen-Lektin-ähnlichen-Rezeptoren erkannt werden. Zunehmende Aufmerksamkeit erhält dabei beispielsweise der inhibierende NKG2A/CD94-Rezeptorkomplex, dem eine Funktion als *Immune-Checkpoint* zugeschrieben wird und dessen Expressionsniveau bei verschiedenen Krebs- und Viruserkrankungen mit einem erschöpften NK-Zell-Phänotyp und einer schlechteren Prognose der Patienten korreliert (Juengpanich *et al*, 2019; Kamiya *et al*, 2019; Sun *et al*, 2016; Yaqinuddin & Kashir, 2020; C. Zhang *et al*, 2019). Eine weitere Besonderheit innerhalb der KLR-Rezeptorfamilie besteht bei dem aktivierenden NKG2C/CD94-Rezeptorkomplex, der neuen Erkenntnissen zufolge bei bestimmten Virusinfektionen in einer Subpopulation von NK-Zellen hochreguliert wird und zur Ausbildung von NK-Zellen mit einem *memory-like* Phänotyp beiträgt (Capuano *et al*, 2019; Cerwenka & Lanier, 2016; Jost *et al*, 2020). Ebenfalls ein wichtiger Vertreter der NKG2-Familie ist der aktivierende NKG2D-Rezeptor, dem eine zentrale Stellung in der Immunüberwachung zugeschrieben wird (Waldhauer & Steinle, 2008). NKG2D-Liganden werden in gesunden Zellen meist nicht oder nur geringfügig exprimiert und erst durch zellulären Stress oder durch die Aktivierung spezifischer Signalwege hochreguliert (Raulet *et al*, 2013). Bei Krebserkrankungen gilt eine gesteigerte Expression membrangebundener NKG2D-Liganden auf Tumorzellen als prädiktiver Marker für den Krankheitsverlauf und kann zu einer erhöhten Effektorfunktion von NKG2D-exprimierenden Immunzellen beitragen (Schmiedel & Mandelboim, 2018; Zhao *et al*, 2017). Auch NKp30, NKp44, NKp46 und NKp80, die allesamt zur Familie der aktivierenden NCRs gehören, tragen zu einer effektiven Lyse von Tumor- oder Virus-infizierten Zellen bei. Zu den bisher bekannten Liganden der NCRs gehören Moleküle wie beispielsweise Galectin-3, B7-H6 oder Hämagglutinin, welche auf der Oberfläche transformierter und infizierter Zellen vorzufinden sind. Darüber hinaus vermittelt NKp30 die Interaktion von NK-Zellen und DCs, durch welche NK-Zellen einen Einfluss auf den Reifungszustand und die Qualität der dendritischen Zellen ausüben und somit zur Induktion einer adaptiven Immunantwort beitragen (Pende *et al*, 2006; Simhadri *et al*, 2008; Walzer *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2017). Neben den oben beschriebenen Rezeptoren können NK-Zellen auch den aktivierenden Rezeptor FcγRIIIA (CD16) exprimieren, der im Zusammenspiel mit IgG-Molekülen eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl., *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) auslöst.

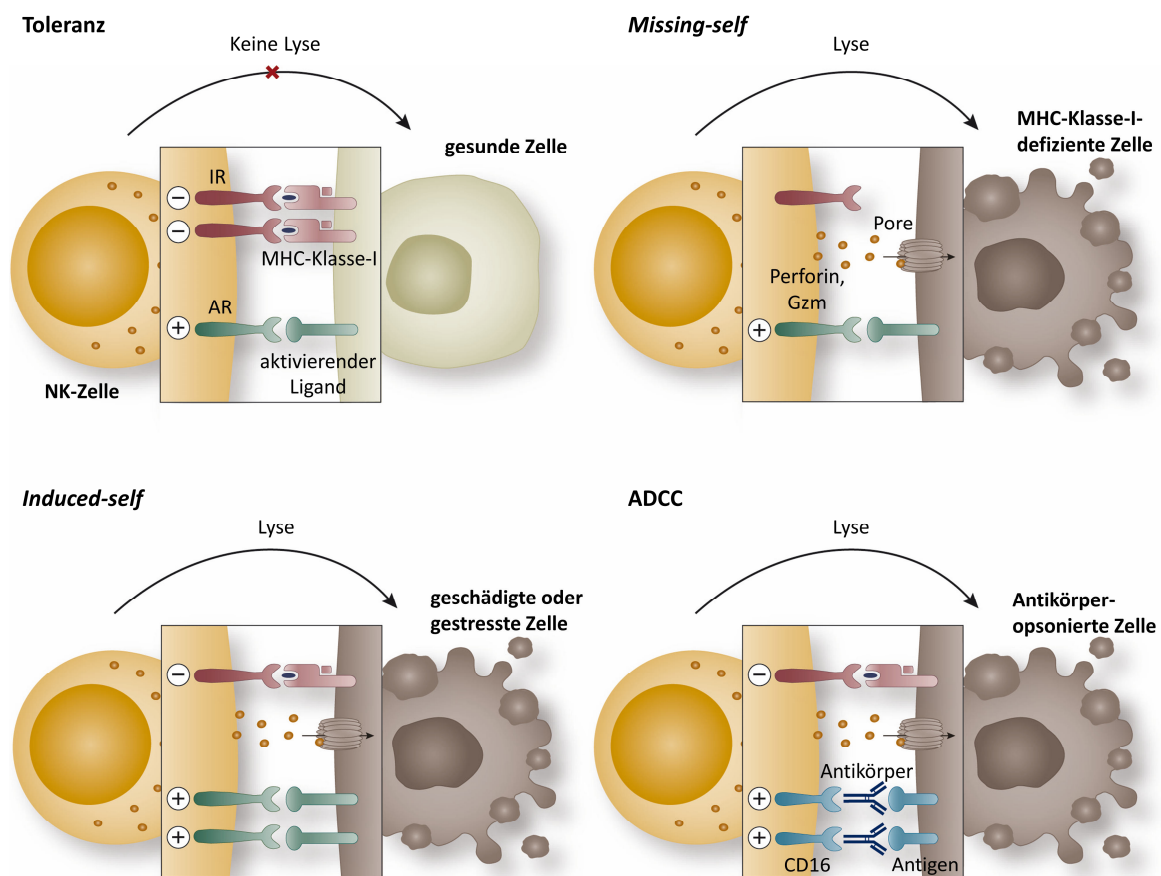
Aktivierende Rezeptoren sind mit akessorischen Adaptormolekülen wie DAP-10, DAP-12, Fc $\gamma$  oder CD3 $\zeta$  assoziiert, welche durch die Aminosäuresequenz YxxL/Ix<sub>(6-8)</sub>YxxL/I charakterisierte Immunrezeptor Tyrosin-basierte Aktivierungsmotive (engl., *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, ITAM) enthalten (Billadeau & Leibson, 2002; Fasbender *et al*, 2017; Lanier, 2001). Nach Aktivierung des jeweiligen Rezeptors werden im ITAM enthaltene Tyrosin-Reste durch Kinasen der Src-Familie phosphoryliert und setzen dadurch eine Signaltransduktionskaskade in Gang (Watzl, 2014). Dabei werden zunächst die SH2 Tyrosin-Kinasen Syk (engl., *Spleen tyrosin kinase*) und ZAP-70 (engl., *Zeta-chain associated protein 70*) rekrutiert (Lanier, 2008), die wiederum eine Phosphorylierung weiterer Signalmediatoren wie beispielsweise Phosphoinositid-3-Kinase (PI-3K), Phospholipase C und Vav vermitteln. Nach Aktivierung dieser Signalwege wird der Einstrom von Calcium-Ionen, die Degranulation der zytotoxischen Granula und die Produktion von Zytokinen gefördert (Long *et al*, 2013; Watzl, 2014).

Die Signaltransduktion inhibierender Rezeptoren wird über ein gemeinsames, in der zytoplasmatischen Domäne lokalisiertes Signalmotiv, das Immunrezeptor Tyrosin-basierte Inhibierungsmotiv (engl., *Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*, ITIM) vermittelt, welches durch die konservierte Aminosäuresequenz I/VxYxxL gekennzeichnet ist (Burshtyn & Long, 1997). Die Ligandenbindung durch inhibierende Rezeptoren resultiert in der Phosphorylierung von Tyrosin-Resten innerhalb des ITIM und im Folgenden zur Rekrutierung von Phosphatasen wie beispielsweise SHIP (engl., *SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase*), SHP-1 und SHP-2 (engl., *SH2-containing protein tyrosine phosphatase-1/2*) (Ravetch & Lanier, 2000). Diese können der Signaltransduktion von aktivierenden Rezeptoren entgegenwirken, indem sie beispielsweise die Dephosphorylierung von Signalmediatoren wie Vav-1, ZAP-70 und Phospholipasen bewirken und eine Hydrolyse von PIP3 induzieren (Binstadt *et al*, 1996; Charlier *et al*, 2010; Kerr, 2011; Stebbins *et al*, 2003). Somit entsteht bei Integration gleichzeitiger aktivierender und inhibierender Signale tendenziell eine Dominanz der inhibierenden Rezeptoren, wodurch eine Stimulation von NK-Zellen durch aktivierende Rezeptoren verhindert wird (Levi-Schaffer, 2018; Long *et al*, 2013).

### 1.2.2 Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität

Die durch die aktivierenden und inhibierenden Rezeptoren gesteuerten Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität können durch die sogenannte *Missing-self*- und *Induced-self*-Hypothese sowie dem Prinzip der Antikörper-abhängigen zellvermittelten Zytotoxizität beschrieben werden (siehe Abb. 1.2). Hierbei reguliert das Zusammenspiel der Rezeptoren die jeweilige Aktivität der NK-Zellen. Gesunde Zellen übertragen durch ihre natürliche MHC-Klasse-I Expression überwiegend inhibierende Signale, sodass eine Lyse durch NK-Zellen unterbunden wird. Gemäß der *Missing-self*-Hypothese führt eine verminderte Expression von körpereigenen MHC-Klasse-I-Molekülen zu einer Reduktion inhibierender

Signale, wodurch das Gleichgewicht zugunsten der aktivierenden Signaltransduktion verschoben und die Zielzelle lysiert wird (Kärre *et al*, 1986; Ljunggren *et al*, 1988; Morvan & Lanier, 2016). Die Beobachtung, dass auch Zielzellen mit physiologischer MHC-Klasse-I Expression von natürlichen Killerzellen lysiert werden, kann durch die *Induced-self*-Hypothese erklärt werden (Jacobs *et al*, 2012). Zellulärer Stress hat dabei eine veränderte Expression von Oberflächenmolekülen zur Folge, welche durch aktivierende Rezeptoren der NK-Zelle erkannt werden. Überwiegt dabei die Transduktion aktivierender Signale, so folgt ein Abtöten der Zielzelle. Ein weiterer Mechanismus, der eine durch NK-Zellen vermittelte Erkennung von infizierten oder malignen Zellen ermöglicht, ist die ADCC. Die Expression des niedrig-affinen Fc-Rezeptors CD16 befähigt NK-Zellen dabei, IgG-Antikörper zu binden und Antikörper-markierte Zellen zu lysieren (Morvan & Lanier, 2016).



**Abb. 1.2 Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität.** NK-Zellen integrieren Signale aktivierender (AR) und inhibierender Rezeptoren (IR), die mit Liganden der Zielzelle interagieren. Gesunde Zellen induzieren dabei eine Selbsttoleranz. Eine fehlende oder veränderte MHC-Klasse-I Expression führt zur Aktivierung der NK-Zelle und folglich zur Lyse der Zielzelle (*Missing-self*). Dies kann auch durch die gesteigerte Expression von Stress-Liganden und somit eine dominierende Signalgebung durch aktivierende Rezeptoren induziert werden (*Induced-self*). Weiterhin können NK-Zellen über den CD16-Rezeptor durch Interaktion mit Antikörper opsonierten Zellen aktiviert werden und die Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (engl., *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) einleiten.

Nach der Aktivierung nutzen NK-Zellen im Wesentlichen zwei Kontakt-abhängige Mechanismen zur Eliminierung von Zielzellen, die einerseits eine sekretorische Lyse und andererseits die Bindung von Zelltod-auslösenden Liganden an Todesrezeptoren beinhalten. Hierbei wird die Zytotoxizität von NK-

Zellen hauptsächlich über den sekretorischen Weg vermittelt, welcher die schnellstmögliche Beseitigung von Zielzellen gewährleistet (Lieberman, 2003). Die Exozytose lytischer Granula erfolgt in einem mehrstufigen Prozess, in welchem zunächst eine Kontaktzone, die sogenannte immunologische Synapse (IS) zwischen NK-Zelle und Zielzelle gebildet wird. Während der Initiierungsphase heften sich Adhäsionsmoleküle der NK-Zelle wie beispielsweise LFA-1 (engl., *Lymphocyte function-associated antigen 1*), CD2 oder CD11b an Liganden der Zielzelle und führen so zu einer Rezeptor-vermittelten Zell-Zell-Verbindung. Im Zentrum dieser Kontaktzone akkumulieren aktivierende und inhibierende Rezeptoren, welche die weitere Aktivität der NK-Zelle regulieren (Orange, 2008). Induzieren diese Signale eine Aktivierung der NK-Zelle, wird die Effektorphase eingeleitet und die lytische Synapse ausgebildet (Krzewski & Coligan, 2012). Im Folgenden vermittelt das Signalosom aus aktivierenden Effektormolekülen den Einstrom von Calcium-Ionen ( $Ca^{2+}$ ) und eine dynamische Reorganisation des Zytoskeletts, wobei eine Polymerisation von Aktinfilamenten zur Stabilisierung der IS und eine Lokalisation des MTOC (engl., *Microtubule organizing center*) in Richtung des synaptischen Spalts erfolgt. Lytische Granula werden entlang der Mikrotubuli zum MTOC transportiert und fokussieren sich folglich an der immunologischen Synapse. Im Zuge der Degranulation erfolgt eine gerichtete Exozytose. Proteine der SNARE (engl., *Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor accessory-protein receptor*)-Familie regulieren dabei die  $Ca^{2+}$ -abhängige Fusion der sekretorischen Granula mit der Plasmamembran, sodass Effektorproteine wie beispielsweise Perforin, Granzyme (Gzm), aber auch lösliche Todesliganden wie FasL und TRAIL in den synaptischen Spalt ausgeschüttet werden (Krzewski & Coligan, 2012). Durch die Zusammenlagerung mehrerer Perforin-Moleküle werden Poren in der Membran der Zielzelle gebildet, die infolgedessen permeabilisiert und für andere Effektormoleküle zugänglich wird. Der bekannteste Vertreter dabei ist Gzmb, eine Serinprotease, die Caspasen und weitere Substrate wie beispielsweise BID (engl., *BH3 interacting domain death agonist*) und PARP (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase) spalten und dadurch die Apoptose der Zielzelle induzieren kann (Krzewski & Coligan, 2012; Prager *et al*, 2019). In der anschließenden Terminierungsphase wird der Kontakt zur Zielzelle gelöst, welche unter anderem durch die Internalisierung spezifischer Aktivierungsrezeptoren auf NK-Zellen und einen durch Apoptose vermittelten Verlust an Oberflächenproteinen auf der Zielzelle gekennzeichnet ist (Anft *et al*, 2020; Netter *et al*, 2017).

NK-Zellen besitzen die Fähigkeit, anschließend lytische Granula und Effektorproteine zu recyceln oder neu zu synthetisieren (Li *et al*, 2011; Liu *et al*, 2005), sodass mehrere aufeinander folgende Zielzellen lysiert werden können (engl., *Serial killing*) (Bhat & Watzl, 2007; Choi & Mitchison, 2013). Führt die wiederholte Exozytose dennoch zu einer Erschöpfung der lytischen Granula, können NK-Zellen weiterhin die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in Zielzellen einleiten (Gwalani & Orange, 2018; Prager *et al*, 2019). Aktivierte NK-Zellen exprimieren hierfür membrangebundene Liganden wie TRAIL

(engl., *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*) oder Fas-Ligand (FasL), welche nach Ausbildung der IS entsprechende Todesrezeptoren auf Zielzellen binden können (Kayagaki *et al*, 1999; Rodella, 1998; Wallin *et al*, 2003; Zamaï *et al*, 1998a). Dies induziert die Multimerisierung der Rezeptoren und die Ausbildung des sogenannten DISC (engl., *Death-inducing signaling complex*), eines Proteinkomplexes, der über die Aktivierung von Caspasen die Apoptose der Zielzelle einleitet (Prager & Watzl, 2019).

### 1.3 Zelluläre Immuntherapien für die Behandlung von Krebserkrankungen

Immuntherapeutische Ansätze zur Behandlung von Krebserkrankungen zielen auf die Stimulation, Modulation oder Unterstützung des endogenen Immunsystems ab, um somit eine gesteigerte, Tumormunität zu vermitteln und gleichzeitig einer immunologischen Toleranz entgegenzuwirken. Während klassische Behandlungsstrategien wie die chirurgische Resektion von Tumoren, Chemotherapie oder Bestrahlung auch gesundes Gewebe angreifen, zeichnen sich Immuntherapeutika in der Regel durch eine verbesserte Tumorspezifität aus (Carazas *et al*, 2021). Darüber hinaus bieten sie die Möglichkeit einer Langzeit-Immunität, welche Patienten vor einer wiederkehrenden Erkrankung schützen kann. Aktuelle Behandlungsansätze schließen dabei unter anderem therapeutische Antikörper gegen Tumorantigene oder *Checkpoint*-Moleküle, onkolytische Viren, Immunmodulatoren wie beispielsweise Zytokine, Tumorstoffe sowie den adoptiven Transfer von Immunzellen ein (Disis, 2014; Farkona *et al*, 2016).

Das Konzept der adoptiven zellulären Immuntherapie (engl., *Adoptive cell therapy*, ACT) basiert auf der Infusion unterschiedlicher Effektorzellen, die durch die Induktion einer tumorreaktiven Immunantwort entartete Zellen und Metastasen eliminieren sollen. Ihre Ursprünge findet die ACT in Studien von Rosenberg und Kollegen, in welchen *ex vivo* kultivierte und expandierte Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) oder tumorinfiltrierende Lymphozyten (TIL) für die erfolgreiche Behandlung tumortragender Mäuse eingesetzt wurden (Rosenberg *et al*, 1986). Die Translation dieser Erkenntnisse in eine klinische Studie zeigte, dass die Reinfusion *ex vivo* expandierter, autologer TILs in Kombination mit IL-2 bei Patienten mit metastasierendem Melanom eine Ansprechrate von 30 % vermitteln konnte (Rosenberg *et al*, 1998, 1990). Eine weitere Steigerung der Remissionsrate konnte zudem durch ein optimiertes Kultivierungsprotokoll und der lymphodepletierenden Präkonditionierung von Patienten erzielt werden (Dudley *et al*, 2008; Ithaki *et al*, 2011; Rosenberg *et al*, 2011). Da *ex vivo* expandierte und reinfundierte TILs vor allem aus T-Zellen bestehen, richtet sich diese Therapie allerdings vornehmlich gegen Krebserkrankungen mit Tumorzellen hoher Immunogenität und Mutationsrate (Qin *et al*, 2021). Die Therapieerfolge bei Patienten mit metastasierendem Melanom lassen sich daher auf die hohe Mutationslast dieser Tumoren zurückführen (Lawrence *et al*, 2013), während bei

Tumorentitäten mit geringerer Immunogenität durch ACT mit autologen TILs bisher nur moderate Erfolge erzielt wurden (Garber, 2019). Darüber hinaus wird die Effizienz einer ACT mit TILs von weiteren Faktoren beeinflusst. Beispielsweise können TILs nicht immer in ausreichenden Mengen isoliert und expandiert werden oder einen dysfunktionalen Phänotyp aufweisen (Chmielewski *et al*, 2014; Qin *et al*, 2021). Daher werden neben den initial eingesetzten, autologen Effektorzellen bei einer Vielzahl von hämatologischen Erkrankungen weitere Behandlungsstrategien verfolgt, darunter beispielsweise die Transplantation von allogenen hämatopoetischen Stammzellen (engl., *Hematopoietic stem cells*, HSCs). Hierbei zeichnet sich die allogene Stammzelltransplantation (alloSCT) durch ein hohes kuratives Potenzial aus, kann allerdings auch mortalitätsrelevante Nebenwirkungen wie beispielsweise eine akute oder chronische *Graft-versus-Host Disease* (GvHD) verursachen (Mohty & Mohty, 2011). Weitere Komplikationen wie ein Abstoßen der transplantierten Zellen durch eine fehlende Toleranzinduktion oder ein ausbleibender *Graft-versus-Tumor*-Effekt können den Erfolg einer alloSCT limitieren. Erhebliche Fortschritte im Feld der ACT wurden durch die genetische Modifikation von autologen oder allogenen Effektorzellen erzielt. Dazu werden die Effektorzellen mit T-Zell-Rezeptoren (engl., *T cell receptor*, TCRs) oder mit chimären Antigenrezeptoren (CARs) ausgestattet, um eine gesteigerte und spezifische Tumorreaktivität zu induzieren. Im Gegensatz zur ACT mit TILs oder allogenen Stammzellen besitzen genmodifizierte Effektorzellen den Vorteil, dass sie eine definierte Spezifität aufweisen und zudem relativ einfach aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts (engl., *Peripheral blood mononuclear cell*, PBMCs) gewonnen werden können (Chmielewski *et al*, 2014; Jin *et al*, 2018; Wang & Rivière, 2016).

### 1.3.1 Chimäre Antigenrezeptoren (CARs)

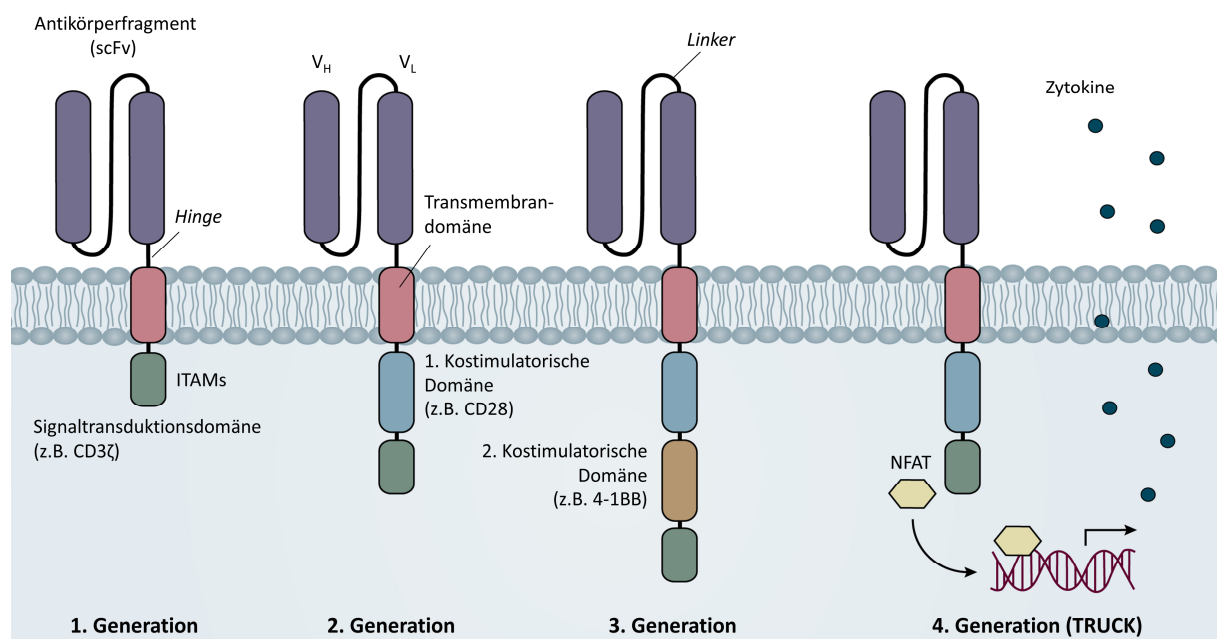
Die adoptive Immuntherapie erzielte durch den Einsatz von chimären Antigenrezeptoren (engl., *Chimeric antigen receptors*, CARs) vor allem im Bereich der hämatologischen Krebserkrankungen in den letzten Jahren erhebliche Behandlungserfolge. Die ersten Zulassungen solcher Therapien erfolgten über die US-Arzneimittelbehörde FDA im Jahr 2017 für die zwei CD19-spezifischen CAR-T-Zelltherapeutika Yescarta (Axicabtagene) und Kymriah (Tisagenlecleucel), welche für die Behandlung von Patienten mit rezidivierender oder refraktärer akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und Formen des *Non-Hodgkin*-Lymphoms (NHL) eingesetzt werden (Albinger *et al*, 2021; Seimetz *et al*, 2019). Zudem wiesen die Produkte Tecartus (Brexucabtagene autoleucel), Breyanzi (Lisocabtagene maraleucel), Abecma (Idecabtagene vicleucel) und Carvykti (Ciltacabtagene autoleucel) in klinischen Studien bei Patienten mit verschiedenen Formen von Leukämien oder Lymphomen erfolgsversprechende Ansprechraten auf und erhielten in den letzten Jahren ihre Marktzulassung durch die FDA und EMA. Derzeit werden mehr als 1200 CAR-basierte Studien verzeichnet, was die bemerkenswerten Therapieerfolge und das Potenzial dieses immuntherapeutischen Ansatzes verdeutlichen (<https://clinicaltrials.gov/>).

Chimäre Antigenrezeptoren, die erstmals in der Pionierarbeit von Eshhar und Kollegen beschrieben wurden, verbinden die spezifischen, antigenbindenden Eigenschaften eines monoklonalen Antikörpers mit signaltransduzierenden Elementen des T-Zell-Rezeptors, die in einem rekombinanten, chimären Transmembranprotein vereint sind (Eshhar *et al*, 1993). CAR-exprimierende Effektorzellen erlangen somit eine neu definierte Antigen-Spezifität für oberflächenassoziierte Moleküle, darunter Proteine, Ganglioside oder Kohlenhydrate und können folglich Zielzellen, die solche Strukturen aufweisen, lysieren (Ponterio *et al*, 2020; Thurin, 2021). Im Gegensatz zu TCR-modifizierten Effektorzellen, zeichnen sich CAR-Moleküle durch eine MHC-Klasse-I unabhängige Bindung der Antigene aus, sodass eine Erkennung von Zielzellen auch bei aberranter Antigen-Prozessierung oder fehlregulierter MHC-Präsentation gewährleistet ist. Die Spezifität von CARs wird in der Regel durch ein synthetisches Antikörperfragment, ein sogenanntes scFv (engl., *Single chain fragment variable*) definiert, das sich aus den variablen Domänen der leichten und der schweren Kette eines klassischen Antikörpers zusammensetzt, die über einen kurzen Peptid-*Linker* verbunden sind (Abb. 1.3). Chimäre Antigenrezeptoren der ersten Generation bestehen neben dem extrazellulären scFv-Fragment aus einer beweglichen Gelenkregion (*hinge*), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären, ITAM-enhaltenden Signaltransduktionsdomäne wie beispielsweise CD3 $\zeta$  oder Fc $\epsilon$ R1 $\gamma$  (Boyiadzis *et al*, 2018). Modifizierte T-Zellen, die CARs der ersten Generation exprimieren, zeigten *in vitro* eine selektive Lyse Antigen-exprimierender Tumorzellen und wurden in klinischen Studien auf ihre Verträglichkeit und Wirksamkeit untersucht (Kershaw *et al*, 2006; Park *et al*, 2007; Pule *et al*, 2008; Till *et al*, 2008). Allerdings stellte sich heraus, dass die transplantierten CAR-T-Zellen aufgrund einer fehlenden Kostimulation in einen Zustand der Anergie übergingen und dadurch nur moderate Ansprechraten erzielt werden (Brocker & Karjalainen, 1995; Feins *et al*, 2019).

Die Effektorfunktionen der T-Zellen und die sich daraus ergebenden Therapieerfolge konnten dann durch die Entwicklung von CARs der zweiten und dritten Generation erheblich gesteigert werden. Dafür wurden in CAR-Moleküle zusätzlich eine (*2nd Generation*) oder mehrere kostimulatorische Domänen (*3rd Generation*) beispielsweise abgeleitet von CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX-40 (CD134) oder ICOS integriert (Weinkove *et al*, 2019). In präklinischen und klinischen Studien ließen sich neben einer gesteigerten Aktivierung der T-Zellen auch eine erhöhte Persistenz, Expansion und Zytokinsekretion beobachten (Carpenito *et al*, 2009; Kalos *et al*, 2011; Savoldo *et al*, 2011; Song *et al*, 2012). Da in Abhängigkeit von der kostimulatorischen Domäne unterschiedliche Signale transduziert werden, ist noch nicht endgültig geklärt, welche der Moleküle das bevorzugte Aktivierungsprofil induzieren (Guedan *et al*, 2018; Salter *et al*, 2018). Ob die Vorteile verschiedener kostimulatorischer Moleküle tatsächlich in CARs der dritten Generation kombiniert werden können, ist gegenwärtig Teil zahlreicher Forschungsarbeiten (Jayaraman *et al*, 2020). Zudem ist mittlerweile bekannt, dass weitere Parameter



wie beispielsweise die Bindeaffinität des scFv-Fragments, die Epitop-Lokalisation innerhalb des Antigens, die Länge des *Linkers* und der *hinge*-Region und auch die Art der Transmembrandomäne zur Aktivität, Spezifität und Persistenz von CAR-exprimierenden Effektorzellen beitragen (Abate-Daga & Davila, 2016; Guedan *et al*, 2018; Jayaraman *et al*, 2020). Während beeindruckende Erfolge bei der Behandlung von hämatologischen Erkrankungen erzielt wurden, zeigen CAR-T-Zellen bei soliden Tumoren bisher noch unzureichende Wirksamkeit. Die Aktivität von CAR-exprimierenden Effektorzellen kann bei soliden Krebserkrankungen erheblich eingeschränkt sein, da solche Tumoren eine heterogene Antigen-Expression und ein immunsuppressives Tumormikromilieu (engl., *Tumor microenvironment*, TME) aufweisen können. Um einen immunmodulatorischen Einfluss auf das TME auszuüben und die endogene Immunantwort zu stimulieren, wurden CARs der vierten Generation (*armored* CARs) entwickelt. Diese zeichnen sich durch die Sekretion von Zytokinen oder Antikörpern sowie daraus abgeleiteter Moleküle oder die Expression von zusätzlichen Zytokin-Rezeptoren aus (Hawkins *et al*, 2021; Huang *et al*, 2020).



**Abb. 1.3 Chimäre Antigenrezeptoren (CARs).** Schematischer Aufbau von CARs der ersten, zweiten und dritten Generation, sowie *armored* CARs am Beispiel des TRUCK (*T cell redirected for universal cytokine-mediated killing*)-Konzepts. Eine detaillierte Beschreibung ist dem Text zu entnehmen.

So wurden beispielsweise TRUCKs (engl., *T cell redirected for universal cytokine-mediated killing*) generiert, welche Zytokine unter Kontrolle des NFAT-abhängigen (engl., *Nuclear factor of activated T-cells*) minimalen IL-2-Promotors exprimieren. Im Gegensatz zur systemischen Behandlung mit proinflammatorischen Immunmodulatoren, ermöglicht dieser Ansatz die lokale Sekretion von Zytokinen nach Antigenkontakt und Effektorzell-Aktivierung. Dies fördert eine Rekrutierung endogener Immunzellen in den Tumor, die dann eine sekundäre Immunantwort induzieren können (Chmielewski & Abken, 2020; Kueberuwa *et al*, 2018).



Mit dem Ziel einer Immunevasion durch Antigen-negative Tumorvarianten entgegenzuwirken, wurden außerdem Konzepte zur Erweiterung der Antigenspezifität entwickelt. So wurden beispielsweise SUPRA (engl., *Split, Universal, and Programmable*)- oder Adapter-CARs generiert, die mit löslichen Antikörpermolekülen zusammenwirken und dadurch eine Vernetzung von Tumor- und Effektorzellen ermöglichen (Bachmann, 2019; Cho *et al*, 2018). Solche Antikörpermoleküle binden dabei ein definiertes TAA auf Tumorzellen und interagieren gleichzeitig mit der extrazellulären Domäne des CAR-Moleküls auf der Effektorzelle. Durch den Einsatz multipler Antikörper als Adaptermolekül mit unterschiedlicher Antigen-Spezifität können heterogene Krebserkrankungen mit dem gleichen CAR behandelt werden, wodurch keine weitere genetische Modifikation der Effektorzelle vorgenommen werden muss.

Da der adoptive Transfer von CAR-T-Zellen starke oder sogar lebensbedrohliche Nebenwirkungen verursachen kann, wurden neben Ansätzen für eine optimierte Anti-Tumor-Aktivität auch weitere Strategien zur Verbesserung des Sicherheitsprofils entwickelt. Mögliche Begleiterscheinung der Therapie sind beispielsweise das *Cytokine release syndrome* (CRS), das *Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome* (ICANS), das Tumorlyse-Syndrom oder ein *on-target/off-tumor* Effekt (Schubert *et al*, 2021). Beispielsweise führte die Infusion von ErbB2-spezifischen CAR-T-Zellen in einer Patientin mit metastasierendem Kolonkarzinom zu einem CRS, welches ein fatales Multiorganversagen und den Tod der Patientin auslöste (Morgan *et al*, 2010). Dies führte zu einem sofortigen Abbruch der klinischen Studie. Um solchen Reaktionen schnellstmöglich entgegenwirken zu können, wurden CARs entwickelt, die sogenannte Suizid-Gene wie z.B. das *Herpes simplex Virus Typ 1 Thymidinkinase-Gen* (HSV-tk), eine induzierbare Form der Caspase-9 (iCasp9) oder einen trunkierten EGFR (engl., *Epidermal growth factor receptor*) als Sicherheitsschalter integrieren (Casucci *et al*, 2018; Gargett & Brown, 2014; Hoyos *et al*, 2010; Jones *et al*, 2014; Paszkiewicz *et al*, 2016). Suizid-Gene ermöglichen nach Applikation bestimmter *Prodrugs*, *Dimerizer* oder Antikörper die gezielte Depletion von CAR-Effektorzellen und können das Risiko lebensbedrohlicher Nebenwirkungen begrenzen.

Die vielfältigen Entwicklungen im Bereich von CAR-T-Zellen verdeutlichen das Potenzial solcher Immuntherapien für die Behandlung von Krebserkrankungen. Aktuelle Forschungen beschäftigen sich auch mit dem Einsatz von CAR-T-Zellen zur Behandlung von Virus-Infektionen oder Autoimmunerkrankungen. Dafür wurden beispielsweise HIV- oder SARS-CoV-2-spezifische CAR-Effektorzellen generiert (Casucci *et al*, 2018; Ma *et al*, 2020; Maldini *et al*, 2018; Mu *et al*, 2020). Zudem konnten CAR-exprimierende regulatorische- und Effektor-T-Zellen in verschiedenen präklinischen Modellen das Auftreten bestimmter Autoimmunerkrankungen verhindern oder eine Linderung der Symptome erzielen, und werden daher aktuell in klinischen Studien auf ihren Nutzen für die Behandlung von Typ-I-Diabetes, Lupus erythematodes oder der GvHD (engl., *Graft-versus-Host Disease*) untersucht

(Blat *et al*, 2014; Bluestone *et al*, 2015; Mackensen *et al*, 2022; Trzonkowski *et al*, 2009). Wie bei einer ACT mit TILs erfolgt die Therapie mit CAR-T-Zellen gegenwärtig mit autologen, *ex vivo* modifizierten Effektorzellen, um die Gefahr einer GvHD zu vermeiden. Die Herstellung der individuellen Zellprodukte erweist sich dabei als sehr zeitaufwendig, ist mit hohen Kosten verbunden und erfordert die Isolierung und Expansion einer ausreichenden Anzahl an körpereigenen T-Zellen, was bei stark vorbehandelten und oft immunkompromittierten Patienten erschwert sein kann. Zunehmende Aufmerksamkeit im Feld der CAR-Technologie erhalten daher NK-Zellen und Makrophagen, die mit geringem GvHD-Risiko als allogenes *off-the-shelf*-Produkt eingesetzt werden können und deren Wirksamkeit und Verträglichkeit als CAR-Effektorzellen derzeit in klinischen Studien erprobt werden (Basar *et al*, 2020; Klichinsky *et al*, 2020; Liu *et al*, 2021b; Mukhopadhyay, 2020).

### 1.3.2 NK-Zellen in der Immuntherapie

In den letzten Jahren haben natürliche Killerzellen für den Einsatz in Immuntherapien zunehmend an Bedeutung gewonnen. Die effektive Eliminierung von Tumorzellen, das günstige Nebenwirkungsprofil sowie die Tatsache, dass NK-Zellen als allogenes *off-the-shelf*-Produkt für eine Vielzahl von Patienten verfügbar gemacht werden können, macht sie zu vielversprechenden Effektorzellen für die Behandlung von Krebserkrankungen. Erste Versuche einer NK-Zell-basierten Immuntherapie wurden zunächst mit autologen Zell-Transfusionen in Kombination mit IL-2 durchgeführt (Grimm *et al*, 1982; Lister *et al*, 1995). Da Tumorzellen im Zuge der Immunevasion verschiedene Resistenzmechanismen gegen körpereigene NK-Zellen entwickeln können und endogene NK-Zellen von Krebspatienten häufig funktionale Defizite aufweisen, wurden mit solchen autologen Transplantationen bisher nur moderate therapeutische Effekte erzielt (Pardoll, 2015; Rouce *et al*, 2016; Sutlu & Alici, 2009; Veluchamy *et al*, 2017). Zunehmende Erkenntnisse der Mechanismen der NK-Zell-Aktivierung führten zu neuen Strategien und dem klinischen Einsatz des adoptiven Transfers allogener NK-Zellen. NK-Zellen können entsprechend der *Missing-self*-Hypothese durch eine fehlende oder aberrante MHC-Expression aktiviert werden. Ebenso resultiert eine HLA-Inkompatibilität (*Mismatch*) zu einer fehlenden Übereinstimmung zwischen inhibierenden NK-Zellrezeptoren des Spenders und den entsprechenden HLA-Klasse-I-Molekülen des Empfängers (Ruggeri *et al*, 1999). Die Verwendung allogener NK-Zellen ist somit von klinischem Vorteil, da sie mit einem gesteigerten *Graft-versus-Leukemia* (GvL)-Effekt einhergeht (Ruggeri *et al*, 2002). Dabei wird die Alloreaktivität durch fehlende Aktivierung inhibierender KIR-Rezeptoren vermittelt, weshalb ein *KIR-ligand Mismatch* mittlerweile als wesentlicher Bestandteil des Spenderprofils gilt (Farag *et al*, 2002; Ruggeri *et al*, 2002). AML-Patienten, welche haploidentische NK-Zellen mit *KIR-ligand Mismatch* infundiert bekamen, zeigten im Gegensatz zur Infusion von NK-Zellen ohne *KIR-ligand Mismatch*, ein verbessertes *Engraftment* und eine gesteigerte Ansprechrate mit geringerer Wahrscheinlichkeit eines Rezidivs (Ruggeri *et al*, 2015). Die gute Verträglichkeit und

Wirksamkeit haploidentischer NK-Zell-Infusionen als Monotherapie oder in Kombination mit einer Stammzelltransplantation wurde auch bei Patienten mit weiteren hämatologischen und soliden Tumorerkrankungen nachgewiesen (Björklund *et al*, 2018; Geller *et al*, 2011; Iliopoulou *et al*, 2010; Miller *et al*, 2005; Rubnitz *et al*, 2015; Yang *et al*, 2016b).

Ähnlich wie bei T-Zellen kann die antitumorale Aktivität von NK-Zellen durch die genetische Modifikation mit CAR-Molekülen gesteigert werden. Neben der Antigen-spezifischen, CAR-vermittelten Lyse von Tumorzellen besitzen solche NK-Zellen weiterhin natürliche Zytotoxizitätsmechanismen und sekretieren nach der Aktivierung pro-inflammatorische Zytokine, welche einen additiven Beitrag zur Tumormunität leisten können. Außerdem sind CAR-NK-Zellen als allogenes *off-the-shelf*-Produkt einsetzbar, da sie im Gegensatz zu allogenen T-Zellen nur ein sehr geringes Risiko der Auslösung einer GvHD aufweisen (Moretta *et al*, 2011; Veluchamy *et al*, 2017). Die Therapie mit CAR-NK-Zellen wird derzeit in ersten klinischen Studien erprobt (Kloess *et al*, 2019; Ran *et al*, 2022; Zhang *et al*, 2022). Vielversprechende Ergebnisse konnten bereits in einer Pilotstudie bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierenden bzw. refraktären CD19-positiven Leukämien und Lymphomen erzielt werden (Liu *et al*, 2020, NCT03056339). Dabei führte die Infusion von aus Nabelschnurblut gewonnenen, *ex vivo* modifizierten CAR-NK-Zellen zu hohen Ansprechraten und vollständigen Remissionen (Liu *et al*, 2020). Um NK-Zellen für den klinischen Einsatz in ausreichenden Mengen, einem hohen Reinheitsgrad und mit einer hohen Aktivität verfügbar zu machen, wurden zahlreiche Protokolle entwickelt, die eine effiziente Expansion, Aufreinigung und Stimulation beinhalten (Mehta *et al*, 2018; Miller *et al*, 2005; Veluchamy *et al*, 2017; Verneris & Miller, 2009; Xie *et al*, 2020). Für die Herstellung von CAR-NK-Zellprodukten werden primäre NK-Zellen vor allem aus mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) und der Nabelschnur isoliert. Diese zeichnen sich allerdings durch eine hohe Donor-Variabilität und ein eingeschränktes Proliferationspotenzial aus (Smith *et al*, 2020). Darüber hinaus kann eine unzureichende Depletion von T-Zellen nach der Infusion in Patienten zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie beispielsweise einer GvHD führen. Alternativansätze die sich vor allem durch eine hohe Expansionsfähigkeit auszeichnen, beinhalten daher die gezielte Differenzierung von NK-Zellen aus induzierten Stammzellen (engl., *Induced pluripotent stem cells*, iPSCs) (Knorr *et al*, 2013; Li *et al*, 2018). Die Verträglichkeit und der therapeutische Effekt von aus iPSCs abgeleiteten CAR-NK-Zellen wird derzeit in klinischen Studien untersucht (Ran *et al*, 2022; Zhang *et al*, 2022; NCT05336409; NCT04245722). Neben aus Spendern gewonnenen oder aus iPSCs differenzierten NK-Zellen eignen sich grundsätzlich auch etablierte Zelllinien für die Entwicklung von *off-the-shelf*-NK-Zelltherapeutika (Klingemann *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2019b). Aktuelle klinische Studien werden dabei mit der NK-Zelllinie NK-92 durchgeführt, die sich durch ein hohes zytolytisches Potenzial gegen eine Vielzahl verschiedener Malignitäten auszeichnet (Gong *et al*, 1994; Klingemann *et al*, 1996).

### 1.3.3 Die NK-Zelllinie NK-92

NK-92 ist eine IL-2-abhängige, kontinuierlich expandierbare humane Zelllinie mit funktionalen und phänotypischen Eigenschaften einer aktivierten NK-Zelle (Gong *et al*, 1994). Die Zelllinie wurde 1992 aus dem Blut eines 50-jährigen Patienten mit fortschreitendem *Non-Hodgkin*-Lymphom isoliert (Gong *et al*, 1994). Aufgrund ihres monoklonalen Ursprungs zeichnen sich NK-92 Zellen durch eine homogene Rezeptorexpression aus (Klingemann *et al*, 2016). Dabei lässt sich die Zelllinie durch die Oberflächenmoleküle CD2, CD7, CD11a, CD28, CD45, CD54 und CD56 bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD3, CD4, CD8, CD16, CD19, CD20 und CD34 charakterisieren (Gong *et al*, 1994). NK-92 Zellen exprimieren eine Vielzahl aktivierender NK-Zellrezeptoren, während sich die Expression inhibierender Rezeptoren auf KIR2DL4, ILT-2 (engl., *Ig-like transcript 2*) und NKG2A/CD94 beschränkt (Maki *et al*, 2001; Tonn *et al*, 2001). Somit besitzen NK-92 Zellen ein vorteilhaftes Aktivierungsprofil, das sich in der zytolytischen Aktivität gegen verschiedenste Malignitäten widerspiegelt (Gong *et al*, 1994; Klingemann *et al*, 1996). Präklinische Studien zeigten beispielsweise, dass die Behandlung mit NK-92 Zellen zu einem verlängerten Überleben von immundefizienten SCID-Mäusen führte, welche zuvor humane Melanom- oder Leukämiezellen injiziert bekamen (Tam *et al*, 1999; Yan *et al*, 1998). Nach multiplen Behandlungsrunden wurden in diesen Modellen keine toxischen Nebenwirkungen beobachtet. Zudem wiesen NK-92 Zellen trotz immortalisierter Eigenschaften keine Langzeitpersistenz auf (Tam *et al*, 1999; Yan *et al*, 1998). Um dennoch das Risiko eines sekundären Lymphoms zu reduzieren, werden NK-92 Zellen beim Einsatz in klinischen Studien vor der Infusion in Patienten mit 10 Gray bestrahlt und damit in ihrer Proliferation gehemmt. Bestrahlte NK-92 Zellen behalten dabei ihre Aktivität und repräsentieren somit eine sichere, wirksame und kostengünstige Alternative zu primären Zellprodukten. Dies vereinfacht eine Standardisierung der Behandlung unter GMP-Bedingungen (Klingemann *et al*, 2016). Aufgrund dieser vorteilhaften Eigenschaften wurden NK-92 Zellen als erste NK-Zelllinie in klinischen Studien für die Behandlung verschiedener Malignitäten eingesetzt (Arai *et al*, 2008; Boyiadzis *et al*, 2017; Tonn *et al*, 2013; Williams *et al*, 2017). Neben einer guten Verträglichkeit systemisch applizierter NK-92 Zellen konnten bei einigen Patienten mit soliden Krebserkrankungen auch ein Therapieansprechen und bei vereinzelt Patienten mit Hämoblastosen sogar eine vollständige Remission beobachtet werden (Arai *et al*, 2008; Boyiadzis *et al*, 2017; Tonn *et al*, 2013; Williams *et al*, 2017).

Eine deutliche Steigerung der antitumoralen Aktivität von NK-92 Zellen konnte durch die genetische Modifikation mit chimären Antigenrezeptoren erzielt werden (Uherek *et al*, 2002; Zhang *et al*, 2017). Dabei wurden zahlreiche CAR-exprimierende NK-92 Zellen entwickelt, die sich durch eine Spezifität für Lymphom- oder Leukämie-assoziierte Tumorantigene wie CD3, CD5, CD19, CD20, CD138 und Flt-3 auszeichnen, aber auch gegen Oberflächenantigene von soliden Tumoren wie beispielsweise EGFR,

EGFRVIII, ErbB2 (HER2), GD2, EpCAM und Mesothelin gerichtet sind (Chen *et al*, 2017, 2016; Daher *et al*, 2021; Esser *et al*, 2012; Genßler *et al*, 2015; Jiang *et al*, 2014; Müller *et al*, 2008; Oelsner *et al*, 2019, 2017, 2017; Sahn *et al*, 2012; Schönfeld *et al*, 2015). Diese CAR-Effektorzellen zeigten in präklinischen *in vitro* und *in vivo* Modellen eine spezifische Lyse von Antigen-positiven Tumorzellen, die resistent gegenüber parentalen NK-92 Zellen waren. Eine in der Arbeitsgruppe Wels generierte CAR-NK-Zelllinie wird derzeit in der weltweit ersten klinischen Studie mit ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen zur Behandlung von Patienten mit einem rezidivierenden Glioblastom untersucht (Burger *et al*, 2019).

### 1.3.4 Die ErbB2-spezifische CAR-NK-Zelllinie NK-92/5.28.z

Bereits 2002 wurden durch unsere Arbeitsgruppe die ersten ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen (NK-92-scFv(FRP5)-ζ) generiert (Uherek *et al*, 2002). Diese Arbeit beschrieb zudem erstmals das Prinzip tumorspezifischer CAR-NK-Zellen. Vielversprechende präklinische Daten und eine weitere Optimierung des eingesetzten CAR-Konstrukts führten zur Entwicklung der monoklonalen NK-92/5.28.z Zelllinie, welche unter einem GMP-konformen Herstellungsprozess generiert wurde und somit für den klinischen Einsatz geeignet ist (Schönfeld *et al*, 2015). Dafür wurden NK-92 Zellen einer FDA-zertifizierten Zellbank mittels lentiviraler Transduktion mit einem CAR der zweiten Generation modifiziert. Dieser setzt sich aus einem ErbB2-spezifischen scFv-Antikörperfragment, einer CD8α-*hinge*-Region, der Transmembran- und kostimulatorischen Domäne von CD28 und der intrazellulären Domäne von CD3ζ zusammen (Schönfeld *et al*, 2015). Das scFv-Fragment wurde dabei aus dem monoklonalen Antikörper FRP5 abgeleitet. Dieser bindet spezifisch an ein von der Membran distal lokalisiertes Epitop innerhalb des ErbB2-Proteins (Grada *et al*, 2013; Wels *et al*, 1992). Eine *on-target/off-tumor*-Toxizität, die bei Verwendung eines von Herceptin abgeleiteten CAR-Konstrukts in T-Zellen beobachtet wurde, trat im Fall von FRP5 basierten CAR-Konstrukten bisher nicht auf (Ahmed *et al*, 2015; Morgan *et al*, 2010; Zhang *et al*, 2017).

Die Spezifität der so erzeugten NK-92/5.28.z Zellen wurde in *in vitro* Analysen validiert, in welchen die CAR-exprimierenden NK-Zellen eine selektive und effiziente Lyse von ErbB2-positiven Tumorzelllinien vermittelten (Schönfeld *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2017). Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine einzelne NK-Zelle in der Lage ist, mehrere aufeinanderfolgende Zielzellen abzutöten (Schönfeld *et al*, 2015). Lokalisationsexperimente in einem orthotopen Brustkrebsmodell zeigten, dass NK-92/5.28.z Zellen bei systemischer Applikation entferntes Tumorgewebe infiltrieren und dort Konjugate mit ErbB2-positiven Tumorzellen bilden. In einem experimentellen Metastasierungsmodell mit ErbB2-positiven Nierenzellkarzinomzellen wurde nach der Behandlung mit NK-92/5.28.z Zellen eine signifikante Reduktion der Zahl an Lungenmetastasen beobachtet (Schönfeld *et al*, 2015). Weiterhin induzierte die Behandlung von immunkompetenten Mäusen mit subkutan oder orthotop implantierten syngenem,

ErbB2-exprimierenden Gliomen nach der lokalen Injektion von NK-92/5.28.z Zellen in einem Großteil der Tiere eine vollständige Remission. Das Abstoßen erneut applizierter Tumorzellen in überlebenden Tieren zeigte, dass die Behandlung mit NK-92/5.28.z neben der direkten zytolytischen Aktivität zudem eine nachfolgende endogene Immunantwort gegen den Tumor und ein immunologisches Gedächtnis vermitteln kann. Die Behandlungserfolge in diesen präklinischen Mausmodellen führte zu einer gegenwärtig noch laufenden klinischen Phase-I-Studie zur Behandlung von Patienten mit einem rezidierten, ErbB2-positiven Glioblastom (CAR2BRAIN; NCT03383978, [clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov)). In der mittlerweile abgeschlossenen Dosis-Eskalationskohorte wurde die gute Verträglichkeit einer einzelnen Injektion bestrahlter NK-92/5.28.z Zellen während einer Rezidivoperation nachgewiesen (Burger *et al*, 2019; Burger *et al*, 2023, zur Veröffentlichung eingereicht). Da ErbB2 wie nachfolgend beschrieben auch beim Mammakarzinom und anderen Tumorentitäten eine wichtige Zielstruktur darstellt, könnte dieser Therapieansatz nach entsprechender präklinischer Validierung auch in weiteren Indikationen klinisch geprüft werden.

## 1.4 Das Mammakarzinom

Mit dem Auftreten von 2,3 Millionen Neuerkrankungen allein im Jahr 2020 gilt Brustkrebs derzeit als häufigste Krebserkrankung weltweit (Sung *et al*, 2021). Trotz einer steigenden Inzidenz ist dennoch eine rückläufige Mortalität zu verzeichnen (Hübner *et al*, 2020). Dies ist vor allem einer verbesserten Diagnostik und individualisierbaren Behandlungsansätzen zu verdanken (Duffy *et al*, 2020). Dennoch forderte die Erkrankung allein im Jahr 2020 mehr als 680.000 Todesopfer, sodass Brustkrebs bei Frauen noch immer als häufigste krebsbedingte Todesursache gilt (Sung *et al*, 2021). Zu Risiko- und Prädispositionsfaktoren zählen verschiedenste Einflüsse wie beispielsweise das Geschlecht, die ethnische Abstammung, ein zunehmendes Alter, Nulliparität, eine frühe Menarche oder eine späte Menopause sowie eine erbliche Veranlagung (Kamińska *et al*, 2015). Bislang sind mindestens zwei Gene bekannt, BRAC1 und BRAC2 (engl., *breast cancer susceptibility 1 and 2*), bei denen Gendefekte zu einem stark erhöhten Risiko führen, an einem hereditären Mammakarzinom zu erkranken (Kuchenbaecker *et al*, 2017). Das Brustkrebsrisiko wird zudem durch extrinsische Faktoren beeinflusst. Dazu gehören beispielsweise eine Hormontherapie in der Peri- und Postmenopause, vitaminarme Ernährung sowie Rauchen und übermäßiger Alkoholkonsum (Kamińska *et al*, 2015). Die Behandlungsaussichten des Mammakarzinoms sind abhängig von der Klassifizierung und dem histologischen Grad der Erkrankung. Die Identifikation von Biomarkern und die Entwicklung immunohistochemischer Diagnoseverfahren ermöglichen es, multimodale und personalisierte Behandlungsansätze auf die Subklassifizierung der Krebserkrankungen abzustimmen (Abreu *et al*, 2014). Diese bauen grundsätzlich auf die zentralen Säulen der Krebstherapie auf und umfassen die chirurgische Resektion des Tumors, die Radiotherapie

und die medikamentöse Behandlung mit Zytostatika. Weiterhin werden zur Behandlung endokrine Therapien und verschiedene immuntherapeutische Ansätze implementiert.

#### 1.4.1 Pathologie und immunhistologische Subklassifizierung des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom ist eine heterogene Tumorerkrankung des Brustdrüsenepithels, welches sich in Abhängigkeit von der Klassifizierung hinsichtlich seiner Histologie, Progression, Invasivität und seines Therapieansprechens erheblich unterscheiden kann (Wieduwilt & Moasser, 2008). Gesundes Brustgewebe besteht im Wesentlichen aus Drüsen-, Fett-, und Bindegewebe und verfügt über Versorgungsstrukturen wie Blut- und Lymphgefäße. Das Drüsengewebe (*Glandula mammaria*) setzt sich aus Drüsenlappen (*Lobi*) zusammen, die sich aus milchproduzierenden terminalen duktulo-lobulären Einheiten (TDLE), einem baumartig verzweigten Hauptausführungsgang (*Ductus lactiferi*) und den Milchsäckchen (*Sinus lactiferi*) aufbauen (Becht *et al*, 2019). Dabei bestehen die Milchgänge aus einem luminalen glandulären Epithel, das von myoepithelialen basalen Zellen umschlossen wird. Das Mammakarzinom kann in Abhängigkeit vom Entstehungsort in duktales oder lobuläres Neoplasien eingeteilt werden. Diese können wiederum in nichtinvasive Tumoren (*Carcinoma in situ*) sowie meist daraus hervorgehende invasive Karzinome unterschieden werden (Alcazar *et al*, 2017; Weigelt *et al*, 2010). Die histologische Klassifizierung von Brustkrebs berücksichtigt neben diesen Aspekten auch ein *Grading*, welches die Differenzierung und die Proliferationsrate der entarteten Zellen charakterisiert. Weiterhin erfolgt eine Klassifikation mit Hilfe des TNM-Systems unter Berücksichtigung der Größe des Primärtumors (T), der Ausbreitung von Tumorzellen in Lymphknoten (N) sowie Fernmetastasen (M). Mithilfe immunhistochemischer Surrogatmarker oder Genexpressionsanalysen können distinkte Subklassifizierungen des invasiven Mammakarzinoms abgegrenzt werden, welche maßgebend für die Entwicklung multimodaler Therapiekonzepte sind (Dai *et al*, 2017; Harbeck *et al*, 2019; Perou *et al*, 2000). Dabei werden auf Basis der Expressionsprofile von Östrogen (ER)- und Progesteronrezeptor (PgR), dem Ki67-Index und der Bestimmung des HER2 (engl., *Human epidermal growth factor receptor 2*; ErbB2)-Status die folgenden immunhistochemisch-abgrenzbaren Subklassifikationen unterschieden:

1. Luminales A-Karzinom (ER und/oder PgR positiv, HER2 (ErbB2) negativ, geringer Ki67-Index)
2. Luminales B-Karzinom, das in HER2 (ErbB2) negativ oder HER2 (ErbB2) positiv unterteilt wird:  
     Luminales B-Karzinom, HER2 (ErbB2) negativ (ER und/oder PgR positiv, hoher Ki67-Index)  
     Luminales B-Karzinom, HER2 (ErbB2) positiv (ER und/oder PgR positiv, ErbB2 Überexpression)
3. Nicht-luminales, HER2 (ErbB2) positives Karzinom (ErbB2-Überexpression, ER und PgR negativ)
4. *Triple negative breast cancer* (TNBC) (ER, PgR und HER2 (ErbB2) negativ)

Die molekulare Subklassifizierung des Primärtumors gilt als prädiktiver Parameter für das Ansprechen auf verschiedene Behandlungsansätze und trägt gemeinsam mit dem Tumor-*Grading* und der TNM-



Klassifizierung zu einer prognostischen Einschätzung der Überlebenschancen und des Rezidivrisikos bei. Während Brustkrebs im frühen Stadium als heilbar eingestuft wird, gilt eine metastasierende Erkrankung weiterhin als nicht oder nur schwer behandelbar. Dies wird bei Betrachtung der relativen 5-Jahres-Überlebensrate des Mammakarzinoms mit immunhistochemisch nachweisbarer ER, PgR oder HER2 (ErbB2)-Expression deutlich, welche bei lokalem Brustkrebs bei 99 %, bei regionalem Brustkrebs mit Ausbreitung in umliegenden Geweben oder Lymphknoten bei 86 % und bei Brustkrebs mit Fernmetastasen lediglich bei 28 % liegt (American Cancer Society, 2022). Daher zielt die Therapie bei metastasierendem Brustkrebs vor allem auf eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, den Erhalt der Lebensqualität und letztendlich palliative Maßnahmen ab.

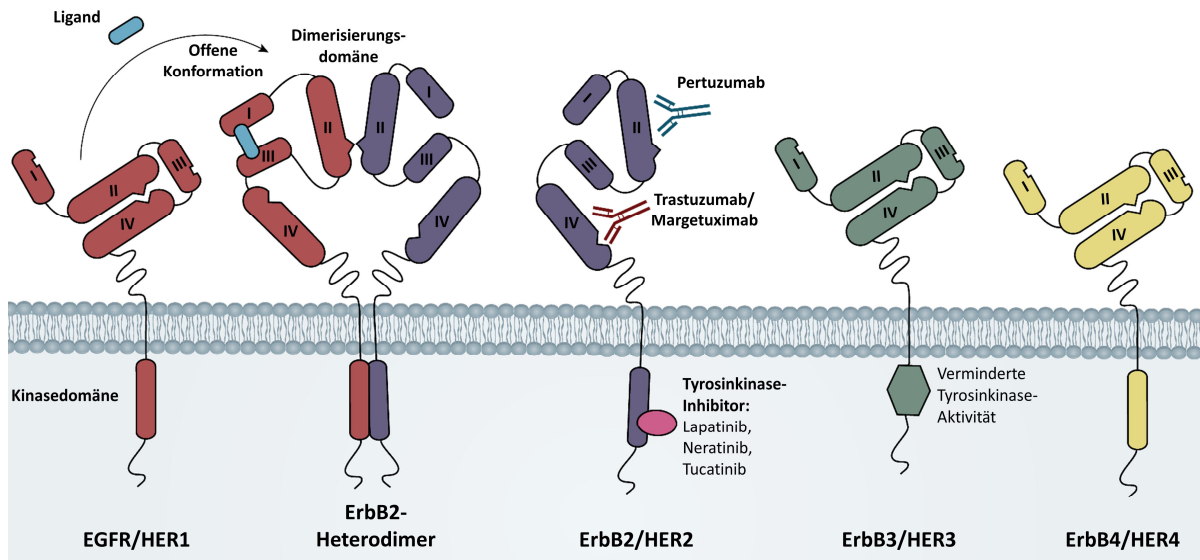
#### 1.4.2 Das HER2 (ErbB2)-positive Mammakarzinom

Das Proto-Onkogen HER2 (auch als ErbB2 bezeichnet) kodiert ein Transmembranprotein mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität aus der Familie der ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen. Neben ErbB2 (HER2) umfasst die Proteinfamilie die Rezeptoren EGFR (ErbB1, HER1), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Dabei weisen die Typ I-Transmembranproteine hohe strukturelle und Sequenzähnlichkeiten auf. Sie bestehen aus einer extrazellulären Ligandenbindedomäne, die sich wiederum aus vier Subdomänen zusammensetzt, einer Transmembrandomäne, einer Juxtamembrandomäne und einer intrazellulären Kinasedomäne (Wieduwilt & Moasser, 2008). Die Ligandenbindung vermittelt eine Konformationsänderung und ermöglicht die Homo- oder Heterodimerisierung zweier ErbB-Rezeptoren (siehe Abb. 1.4). Dies führt zur Aktivierung und resultiert in einer Trans- oder Autophosphorylierung von Tyrosinresten innerhalb der intrazellulären Rezeptordomänen. Im Gegensatz zu anderen ErbB-Rezeptoren besitzt ErbB2 strukturelle Besonderheiten in der Ektodomäne, sodass keine Ligandenbindung erforderlich ist, um eine aktive Konformation zu induzieren (Wieduwilt & Moasser, 2008). ErbB2 ist somit der bevorzugte Bindepartner für die Heterodimerisierung mit anderen ErbB-Rezeptoren (Li *et al*, 2012). In Abhängigkeit von den Liganden und der jeweiligen Kombination an Rezeptor-Dimeren können unterschiedliche Signalkaskaden, wie beispielsweise der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)- oder Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)-Signalweg aktiviert werden, die nachfolgend zelluläre Prozesse wie die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der Zelle steuern. Überexprimiertes ErbB2 besitzt durch seine Liganden-unabhängige Aktivierung transformierendes und mitogenes Potenzial, weshalb es als Treiber für die ungehemmte Zellteilung in neoplastischen Zellen gilt (Olayioye, 2001; Worthylake *et al*, 1999).

Etwa 20-25 % der Patientinnen mit invasivem Mammakarzinom weisen eine Amplifikation, Mutation oder transkriptionelle Fehlregulation des ErbB2-Gens auf, die sich in einer Überexpression des Rezeptors manifestieren und mit einer höheren Aggressivität des Tumors und einer schlechteren



Prognose korrelieren (Jeffrey, 2005; Schlam & Swain, 2021). ErbB2 stimuliert die Zellproliferation, fördert die Metastasierung und Migrationsfähigkeit und ist mit Resistenzmechanismen gegen verschiedene konventionelle Therapieansätze assoziiert. Die prognostische Bedeutung einer ErbB2-Überexpression sowie ein besseres Verständnis der molekularen Grundlagen der nachgeschalteten Signaltransduktion führten zur Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze (Swain *et al*, 2022, 2020). Ein wesentlicher Fortschritt in der Behandlung des ErbB2-positiven Mammakarzinoms konnte dabei durch die Zulassung des monoklonalen Antikörpers Trastuzumab (Herceptin) erreicht werden, dessen neoadjuvanter, adjuvanter, aber auch palliativer Einsatz in Kombination mit Chemotherapie zu einer signifikanten Verbesserung des progressionsfreien Überlebens (engl., *Progression-free survival*, PFS) und des Gesamtüberlebens (engl., *Overall survival*, OS) beitrug (Gianni *et al*, 2014; Rier *et al*, 2017; Slamon *et al*, 2011, 2001). Trastuzumab bindet an die Subdomäne IV (ECD4) des ErbB2-Rezeptors (siehe Abb. 1.4) und bewirkt darüber eine Inhibition der ErbB2-vermittelten Signaltransduktion, induziert Zellzyklusarrest und Apoptose und kann zudem eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität vermitteln (Sliwkowski *et al*, 1999). Als Zweitlinientherapie wurden außerdem Antikörper-Wirkstoff-Konjugate zugelassen, in welchen der Antikörper Trastuzumab an Zytostatika gekoppelt ist, die nach selektiver Internalisierung in ErbB2-exprimierende Zellen eine anti-mitogene Wirkung entfalten (Li *et al*, 2022; Yan *et al*, 2017). Zudem erhielt der Antikörper Margetuximab eine klinische Zulassung, welcher das Fab-Fragment von Trastuzumab enthält, allerdings durch ein optimiertes Design eine höhere Affinität für den FcγRIIIA (CD16A)-Rezeptor aufweist und dadurch zu einer gesteigerten NK-Zell-vermittelten ADCC beitragen kann (Swain *et al*, 2022; Tarantino *et al*, 2021). Ein weiterer monoklonaler Antikörper, Pertuzumab, der die Dimerisierung von ErbB2 mit anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Familie verhindert, zeigte bei der Behandlung von metastasierendem Brustkrebs in Kombination mit Trastuzumab und einer Chemotherapie eine zusätzliche Verlängerung des OS (Swain *et al*, 2020, 2015). Neben therapeutischen Antikörpern erhielten auch *Small molecules* wie Lapatinib, Neratinib und Tucatinib eine klinische Zulassung (Schlam & Swain, 2021). Dabei handelt es sich um Tyrosinkinase-Inhibitoren, welche die intrazelluläre Domäne verschiedener ErbB-Rezeptoren blockieren und somit die Signaltransduktion inhibieren (siehe Abb. 1.4).



**Abb. 1.4 ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen und ErbB2-zielgerichtete Therapieansätze.** Struktureller Aufbau der ErbB-Rezeptorfamilie. Die Rezeptoren bestehen aus einer extrazellulären Domäne, die sich aus vier Subdomänen zusammensetzt, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Rezeptor-Tyrosinkinase-Domäne. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung und ErbB-Rezeptoren können Homo- oder Heterodimere bilden. Dabei besitzt ErbB2 eine Liganden-unabhängige offene Konformation. Zielgerichtete Therapien wie monoklonale Antikörper und Tyrosinkinase-Inhibitoren können an den ErbB2-Rezeptor binden und die Signaltransduktion oder Dimerisierung des Rezeptors verhindern.

Obwohl die zunehmende Implementierung der zielgerichteten Therapien zu einer verbesserten Prognose für Patientinnen mit ErbB2-positiven Mammakarzinomen beiträgt, stellen Therapieresistenzen noch immer ein klinisches Problem dar. Dabei wird zwischen primären, sogenannten intrinsischen Resistenzen und sekundären Resistenzen, welche erst im Laufe einer Behandlung erworben werden, unterschieden. Resistenzmechanismen beruhen beispielsweise auf einer sterischen Hemmung der Antikörperbindestelle durch proteolytische Spaltung der extrazellulären ErbB2-Domäne (p95HER2) oder Epitopmaskierung (Pohlmann *et al*, 2009; Swain *et al*, 2022). Weiterhin konnte ein Verlust von Tumorsuppressoren und damit eine Entkoppelung mitogener Signalwege oder eine kompensatorische Signaltransduktion über andere Rezeptor-Tyrosinkinasen beobachtet werden (Wahdan-Alaswad *et al*, 2020). Auch *Immune-Escape*-Mechanismen wie beispielsweise eine geringere Sensitivität gegenüber den Effektormolekülen Perforin und Granzym B können zu einer gesteigerten Resistenz beitragen (Kawaguchi *et al*, 2009). Die vielfältigen Resistenzmechanismen stellen eine Limitierung derzeitiger Behandlungsmöglichkeiten dar und verdeutlichen, dass Patientinnen mit ErbB2-positivem Mammakarzinom nach wie vor eine stetige Verbesserung vorhandener Therapiekonzepte sowie die Entwicklung innovativer Ansätze benötigen.

### 1.4.3 Präklinische Modellsysteme des (ErbB2-positiven) Mammakarzinoms

Die Entwicklung präklinischer Modellsysteme ist ein wichtiges Bindeglied zur klinischen Translation. Wirksamkeitsstudien werden in der Regel an etablierten Zelllinien oder Primärmaterial durchgeführt und nachfolgend durch geeignete *in vivo*-Modelle ergänzt. Dabei zeichnen sich immortalisierte und

transformierte Zelllinien durch ein unbegrenztes Wachstum aus und ermöglichen Hochdurchsatzuntersuchungen verschiedener Wirkstoffkandidaten sowie die Untersuchung der zugrundeliegenden Wirkmechanismen. Zahlreiche Studien beschäftigten sich mit der Charakterisierung etablierter Brustkrebszelllinien und ermöglichten damit eine Einteilung gemäß der zuvor beschriebenen Subklassifizierungen. Neben umfangreichen *OMICs*-Analysen wurden auch phänotypische Merkmale sowie die Fähigkeit der Invasion beschrieben (Charafe-Jauffret *et al*, 2006; Cope *et al*, 2014; Kao *et al*, 2009; Neve *et al*, 2006; Saunus *et al*, 2018). Dabei wurden auch zahlreiche ErbB2-positive Brustkrebszelllinien identifiziert, die als vereinfachtes Modell einer Krebserkrankung mit dieser Subklassifizierung dienen (Dai *et al*, 2017; Kao *et al*, 2009). Konventionelle ErbB2-positive Brustkrebszelllinien ermöglichten beispielsweise die Charakterisierung potenzieller Biomarker, die eine Behandlungsresistenz prognostizieren (Ginestier *et al*, 2007; Zazo *et al*, 2016). Des Weiteren trugen Herceptin-resistente Zelllinien zur präklinischen Validierung von alternativen Behandlungsansätzen bei (Canonici *et al*, 2013; Jernström *et al*, 2017). Brustkrebszelllinien finden somit Verwendung bei der Etablierung zielgerichteter Therapieansätze und können wichtige Erkenntnisse über die Mechanismen schaffen, die Therapieresistenzen zugrunde liegen. Dennoch können Zelllinien-basierte *in-vitro*-Systeme den Gesamtorganismus nicht ausreichend abbilden. Die fehlende Mikroumgebung und Wechselwirkung mit dem für den Zelltyp physiologischen Stroma führen zu einer drastischen Umprogrammierung der Genexpression. Zelllinien zeichnen sich daher meist durch eine Überexpression von Zellzyklusgenen aus, während Gene, die zur Ausführung der organspezifischen Funktionen notwendig sind, herunterreguliert werden (Lopes-Ramos *et al*, 2017). Epigenetische und transkriptionelle Veränderungen sowie die Ansammlung zusätzlicher Mutationen führen außerdem dazu, dass sich Zelllinien hinsichtlich ihrer Funktion, ihres Genotyps und ihres Differenzierungsgrades erheblich von den ursprünglichen Geweben unterscheiden und somit die klinische Translation damit gewonnener Erkenntnisse erschweren können (Kim *et al*, 2017; Mouriaux *et al*, 2016; Nestor *et al*, 2015).

Die Xenotransplantation etablierter Brustkrebszelllinien in immundefiziente Mäuse kann einige Einschränkungen der Zellkultur überwinden, beispielsweise durch die Möglichkeit der Ausbildung von Fernmetastasen oder multizellulärer Wechselwirkungen durch Bereitstellung eines Stromas. Um die inter- und intratumorale Heterogenität von Tumoren zu konservieren, können außerdem sogenannte *Patient-derived xenograft* (PDX)-Modelle generiert werden, in welchen durch seriell in vivo Passagieren histologische und molekulare Merkmale des Ursprungsgewebes weitestgehend erhalten bleiben (Bruna *et al*, 2016; Georgopoulou *et al*, 2021). Die Etablierung von PDX-Modellen ist jedoch zeit- und kostenintensiv und technisch sehr aufwändig. Vor allem bei ErbB2-positiven Mammakarzinomen wurde in PDX-Modellen eine nur geringe Anwachsrate beobachtet, was eine routinemäßige Anwendung zur Wirkstofftestung bisher erschwert (Murayama & Gotoh, 2019). Um die Entstehung und Progression

von Krebs in einer für diese Erkrankung physiologischen Umgebung zu ermöglichen, können genetisch modifizierte Mausmodelle verwendet werden. In diesen Modellen erfolgt die Karzinogenese, wie auch beim Menschen, unter anhaltendem immunologischen Druck, sodass Tumorzellen zunächst Eigenschaften erlangen müssen, die eine Immunevasion ermöglichen. Dabei zeigen autochthone Tumoren histopathologische und molekulare Eigenschaften, die auch beim humanen Mammakarzinom beobachtet werden. Sie zeichnen sich weiterhin durch intratumorale Heterogenität und die Möglichkeit der Metastasierung aus (Fry *et al*, 2016). Transgene Mausmodelle zur Untersuchung des ErbB2-positiven Mammakarzinoms konnten durch die MMTV-LTR (*mammary tumor virus-long terminal repeat*)-Promotor getriebene Expression des wildtypischen ErbB2, des Ratten-Homologs Neu sowie einer davon abgeleiteten konstitutiv aktiven Form NeuNT generiert werden (Fry *et al*, 2016). Da der MMTV-LTR-Promotor eine Expressionspräferenz für Zellen des Mammaepithels besitzt, ermöglichten solche Modelle die grundlegende Untersuchung histopathologischer Merkmale und Mechanismen der Karzinogenese (Hennighausen, 2000). Weiterhin leisteten MMTV-LTR-Promoter basierte ErbB2-Modelle einen wichtigen Beitrag zur präklinischen Validierung zielgerichteter Immuntherapien wie beispielsweise Herceptin oder Lapatinib. Allgemein ist die Wirkstoffforschung mit solchen Modellen allerdings durch lange Latenzzeiten der Onkogenese erschwert (Finkle *et al*, 2004; Fry *et al*, 2016; Usary *et al*, 2013).

Eine erfolgversprechende Alternative und Ergänzung zu herkömmlichen Modellen stellt die Organoid-Technologie dar. Organoide werden aus pluripotenten oder adulten Stammzellen generiert, die sich innerhalb einer 3D-Matrix in organähnliche Zellverbände organisieren. Unter Verwendung von Hydrogelen werden Wachstumsfaktoren und extrazelluläre Matrixproteine zur Verfügung gestellt, die somit die natürliche Umgebung einer Stammzellnische simulieren. Dadurch werden Stammzellen zur Teilung angeregt und können selbstorganisierte dreidimensionale Strukturen generieren (Hofer & Lutolf, 2021). Charakteristisch für die Organoid-Kultur ist das hohe Regenerationspotenzial der Zellen sowie eine gewebespezifische Differenzierung und Kompartimentierung, sodass etablierte Organoid-Kulturen eine hohe phänotypische und funktionale Übereinstimmung mit dem ursprünglichen Gewebe aufweisen (Kretschmar & Clevers, 2016). Seit der erstmaligen Beschreibung von komplexen Organoiden des Dünndarms im Jahr 2009 wurden 3D-Kulturen aus unterschiedlichsten Organen, wie beispielsweise der Lunge, des Magens, der Leber, des Gehirns oder der Brustdrüse generiert (Kim *et al*, 2020; Kretschmar & Clevers, 2016; Sato *et al*, 2009). Dreidimensionale Brustepithel-Kulturen wurden zunächst in Collagen-Gelen etabliert, in welchen die Zellen verzweigte Acini-ähnliche Strukturen ausbildeten und dabei einen invasiven Phänotyp aufwiesen (Hall *et al*, 1982; Mroue & Bissell, 2013). Durch die Verwendung von Matrigel, einem gelartigen Sekret aus murinen Sarkomzellen, konnte die natürliche Umgebung der Brustdrüse besser nachgebildet werden. Dies ermöglichte die Etablierung

muriner und humaner Mamma-Organoiden aus gesundem Gewebe und auch aus Tumorgewebe (Sumbal *et al*, 2020). So konnte beispielsweise eine Biobank aus über 100 verschiedenen Brustkrebs-Organoiden generiert werden, die umfangreich charakterisiert wurden und das breite Spektrum der Brustkrebsarten widerspiegeln (Sachs *et al*, 2018). Die Organoiden wiesen dabei eine mit dem Tumor vergleichbare Morphologie und Hormon-Rezeptor-Expression auf und zeigten bei *ex vivo Drug Screenings* ein zu Mäusen mit Xenotransplantaten vergleichbares Therapieansprechen (Sachs *et al*, 2018). Somit zeichnet sich die Organoid-Technologie durch ein vielfältiges Anwendungspotenzial aus und kann einen wichtigen Beitrag zur Erforschung der Organogenese, der Karzinogenese und Metastasenbildung sowie der Wirkstofftestung und der Entwicklung personalisierbarer Krebstherapien leisten.

## 1.5 Ziel dieser Arbeit

Als Zelltherapeutikum für Krebspatienten haben natürliche Killerzellen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen. NK-Zellen können nach der Aktivierung eine direkte Lyse von Tumorzellen vermitteln und besitzen durch die Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen immunmodulatorische Eigenschaften. Die in dieser Arbeitsgruppe generierte CAR-NK-Zelllinie NK-92/5.28.z mit Spezifität für die Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 wird gegenwärtig in einer laufenden klinischen Phase-I-Studie zur Behandlung von Patienten mit rezidiviertem, ErbB2-positivem Glioblastom untersucht. Auch bei Patientinnen mit Brustkrebs wird häufig eine Überexpression des Proto-Onkogens ErbB2 auf Tumorzellen beobachtet, was den Einsatz von zielgerichteten Behandlungsansätzen ermöglicht. Obwohl die Implementierung von Behandlungsstrategien basierend auf Antikörpern oder Tyrosinkinase-Inhibitoren zu einer verbesserten Prognose für diese Brustkrebspatientinnen beitrug, stellen primäre oder sekundäre Therapieresistenzen noch immer ein klinisches Problem dar. Entsprechend erscheint die Entwicklung der Zelllinie NK-92/5.28.z hin zu einer adoptiven Immuntherapie für die Behandlung von ErbB2-positivem Brustkrebs sinnvoll.

Ziel dieser Arbeit war daher, das therapeutische Potenzial der ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zelllinie NK-92/5.28.z in einem innovativen *in vitro* Modell des ErbB2-positiven Mammakarzinoms zu untersuchen. Eine spezifische Anti-Tumor-Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen gegen etablierte ErbB2-positive Brustkrebszelllinien wurde bereits im Vorfeld der vorliegenden Arbeit in klassischen 2D-Zellkulturexperimenten gezeigt. Immortalisierte und transformierte Zelllinien unterliegen mit fortschreitender Kultivierungsdauer in der Regel jedoch einer drastischen Umprogrammierung der Genexpression, sodass die zelluläre Heterogenität, der Differenzierungsgrad und die Funktion des ursprünglichen Gewebes nicht ausreichend abgebildet werden. Daher wurde hier ein Organoid-basierter Ansatz entwickelt, welcher die Untersuchung von CAR-exprimierenden NK-Zellen in einem

klinisch relevanten *in vitro* Modell ermöglicht. Organoide werden aus Stammzellen generiert und können sich *ex vivo* in multizelluläre, dreidimensionale Verbände mit gewebeähnlicher Differenzierung und Kompartimentierung organisieren. Derartige Modelle erscheinen daher besser als 2D-Kultursysteme geeignet, innovative Therapieansätze zu untersuchen und zu validieren.

Unter Verwendung von Mamma-Epithelzellen des CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup>-Mausmodells wurden Organoide der murinen Brustdrüse entwickelt, die relevante Mutationen und Signaltransduktionskaskaden des ErbB2-positiven Mammakarzinoms aufweisen. Um das therapeutische Potenzial der CAR-exprimierenden NK-Zellen in diesen 3D-Kulturen einschätzen zu können, galt es, Methoden zu entwickeln, welche eine Untersuchung der Interaktion von Effektor- und Zielzellen erlaubten und eine Quantifizierung der Lyseaktivität der NK-92/5.28.z Zellen ermöglichen. Weiterhin wurde das *Engraftment* der Mamma-Organoide in immundefizienten und immunkompetenten Mäusen untersucht. Die dabei gewonnen Erkenntnisse sollten die Voraussetzung schaffen, um in zukünftigen Arbeiten eine gegen ErbB2-gerichtete CAR-NK-Zell-Therapie im Kontext eines komplexen Tumorstromas und unter Berücksichtigung des Beitrags des endogenen Immunsystems zu evaluieren.

## 2. Material

### 2.1 Laborgeräte und Apparaturen

Die in dieser Arbeit verwendeten Laborgeräte und Apparaturen sind Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Tab. 2.1 Laborgeräte

Bezeichnung	Modell	Hersteller
<b>Autoklav</b>	FVS2 + UWK 20.0	Fedegari (Frankfurt am Main)
<b>Blotting-Apparate</b>	Trans-Blot Turbo	Bio-Rad (Hercules, USA)
<b>Brutschränke</b> -CO <sub>2</sub> -Inkubator -Mikrobiologischer Inkubator	CB150 Kendro HeraCell FunctionLine	Binder (Tuttlingen) Heraeus (Hanau) Heraeus (Hanau)
<b>Chemilumineszenz-Dokumentationssystem</b>	Fusion Fx7	VWR/Peqlab (Radnor, USA)
<b>Durchflusszytometer</b> -Zellanalyse -Zellsortierung	FACSCanto II LSRFortessa FACSAria II FACSAria Fusion	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
<b>Einfrierhilfe</b>	CoolCell LX Mr. Frosty	BioCision (San Rafael, USA) Nalgene (Rochester, USA)
<b>Elektrophoresekammer</b> -Agarose-Gele -SDS-Gele	Mini-Sub Cell GT Cell Wide Mini-Sub Cell GT Cell Mini-Protean II Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
<b>Gefrierschränke</b> -Gefrierschrank (-20°C) -Ultratiefkühlgeräte (-80°C)	U725	Liebherr (Bulle, CHE) New Brunswick/Eppendorf (Hamburg)
<b>Geldokumentationssystem</b>	Fusion Fx7	VWR/Peqlab (Radnor, USA)
<b>In vivo Imaging System</b>	IVIS Lumina II	PerkinElmer (Waltham, USA)
<b>Inkubationsschüttler</b>	HAT Multitron	Infors HAT (Bottmingen, CHE)
<b>Kühlschränke</b>		Liebherr (Bulle, CHE)
<b>Magnetrührer</b>	RET basic	IKA (Staufen)
<b>Mikroskope</b> -Hellfeld (Monochrom/Farbe) -Fluoreszenz -Konfokal	Nikon TMS Axiovert 25 Axio ImagerM2 EVOS FL CQ1	Nikon (Minato, JPN) Zeiss (Oberkochen) Zeiss (Oberkochen) Thermo Scientific (Waltham, USA) Yokogawa (Musashino, JPN)
<b>Mikrotiterplatten-Lesegerät</b>	SpectraMax iD3	Molecular Devices (San José, USA)
<b>Mikrowelle</b>	Mikromat	AEG (Frankfurt am Main)
<b>Netzgeräte</b>	PowerPac 300	Bio-Rad (Hercules, USA)
<b>pH-Meter</b>	MP 220	Mettler-Toledo (Columbus, USA)

<b>Pipetten</b> -Einkanalpipetten	Pipetman P2/P20/P200/P1000	Gilson (Madison, USA)
-Mehrkanalpipetten -Serologische Pipettierhilfe	Research Plus Pipetboy	Eppendorf (Hamburg) Integra Biosciences (Zizers, CHE)
<b>Rollenmischer</b>	RM5-30V	CAT-Ing. (Ballrechten-Dottingen)
<b>Röntgenfilm- Entwicklungsmaschine</b>	XR 24 Pro	Dürr Dental (Bietigheim- Bissingen)
<b>Sicherheitswerkbank</b> -Sterilbank (Klasse 2) -Mikrobiologische Sterilbank	CleanAir (CA/REV 6) HeraSafe	CleanAir (Utrecht, NLD) Heraeus (Hanau)
<b>Spektralphotometer</b>	Evolution 60 Nanodrop 1000	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<b>Thermoblock</b>	Dri-Block DB-2D	Techne (Cambridge, GBR)
<b>Thermocycler</b>	T3000 TGradient	Biometra (Göttingen) Biometra (Göttingen)
<b>Vortex-Gerät</b>	Vortex-Genie 2	Fisher Scientific (Pittsburgh, USA)
<b>Waage</b>	Explorer	Ohaus (Parsippany, USA)
<b>Wasseraufbereitungsanlage</b>	Elix Essential	Merck Millipore (Burlington, USA)
<b>Wasserbad</b>	1003	LAUDA-GFL (Burgwedel)
<b>Zellzähler</b>	Countess II FL	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<b>Zentrifugen</b> -Standkühlzentrifuge -Tischzentrifuge  -Mikrozentrifuge	Avanti J-25 Megafuge 1.0R Rotina 46 R Biofuge pico Mikro 22R	Beckmann Coulter (Brea, USA) Heraeus (Hanau) Hettich (Tuttlingen) Heraeus (Hanau) Hettich (Tuttlingen)

## 2.2 Chemikalien und Reagenzien

In Tabelle 2.2 sind die in dieser Arbeit verwendeten allgemeine Chemikalien und Reagenzien aufgelistet. Weitere Reagenzien finden sich in den nachfolgenden Abschnitten und sind den entsprechenden Methoden zugewiesen.

Tab. 2.2 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Aceton	Carl Roth (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	InvivoGen (San Diego, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe)
BX-795 (PDK1-Inhibitor)	Selleckchem (Houston, USA)
Calcein Violet AM	Invitrogen (Waltham, USA)
Carmin	Carl Roth (Karlsruhe)
CellTrace™ CFSE	Invitrogen (Waltham, USA)
CellTrace™ Far Red	Invitrogen (Waltham, USA)



cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid (DMF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth (Karlsruhe)
ECL Western Blotting Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Ethanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe)
Fluorescein di-β-D-galactopyranoside (FDG)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
FuGENE® HD Transfection Reagent	Promega (Madison, USA)
G418	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Galacton-Plus™ Substrat	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Glutaraldehyd	Carl Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Carl Roth (Karlsruhe)
Hämatoxylin	Carl Roth (Karlsruhe)
Histofix (Formaldehyd, 4 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Hygromycin B	InvivoGen (San Diego, USA)
Ionomycin	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumhexacyanidoferrat(II)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumhexacyanidoferrat(III)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kanamycin	Carl Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Fluka® Analytika (München)
Magnesiumsulfat	Carl Roth (Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdesoxycholat	Carl Roth (Karlsruhe)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe)
NucView® 405 Caspase-3 Substrat	Biotium, Inc. (Fremont, USA)
NucView® 488 Caspase-3 Substrat	Biotium, Inc. (Fremont, USA)
Nutlin 3a (MDM2-Inhibitor)	Selleckchem (Houston, USA)
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA)	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
PhosSTOP™	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Polybren	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Polyethylenimin, 25 kDa linear (PEI)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Saponin	Carl Roth (Karlsruhe)
SuperSignal™ West Femto	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe)
Thymol	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Carl Roth (Karlsruhe)
Triton X-100	Carl Roth (Karlsruhe)
TWEEN® 20	Carl Roth (Karlsruhe)
VivoGlo™ Luciferin	Promega (Walldorf)
X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-Galactopyranosid)	Carl Roth (Karlsruhe)
Xylol	InvivoGen (San Diego, USA)
Y27632 (Rock-Inhibitor)	Selleckchem (Houston, USA)

## 2.3 Puffer und Lösungen

In Tabelle 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten, kommerziell erhältliche Puffer und Lösungen aufgelistet. Die Zusammensetzung weiterer Medien und Lösungen sind den zugehörigen Methoden zu entnehmen. Alle dafür verwendeten Chemikalien und Reagenzien sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tab. 2.3 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (Hercules, USA)
CutSmart® Puffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
DPBS (Dulbecco's <i>phosphate-buffered saline</i> )	Gibco (Waltham, USA)
Ethidiumbromidlösung (1 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Golgi-Stop	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Hoest 33342	Invitrogen (Waltham, USA)
Ketamin (10 %)	Medistar (Ascheberg)
Matrigel ( <i>Growth factor reduced</i> )	Corning (New York, USA)
Rompun 2%	Bayer (Leverkusen)
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	Bio-Rad (Hercules, USA)
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	Gibco (Waltham, USA)
Trypsin/EDTA-Lösung (0,05 %)	Gibco (Waltham, USA)
Vetflurane	Virbac (Carros, FRA)

## 2.4 Verbrauchsmaterial

In Tabelle 2.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien aufgelistet.

Tab. 2.4 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
<b>Autoradiographie-Film (Super RX)</b>	Fujifilm Europe (Düsseldorf)
<b>Deckgläser</b>	Thermo Scientific (Waltham, USA)
<b>Diverse Kunststoffprodukte:</b>	
-Kryo-Einfrierrohrchen	Greiner Bio One (Kremsmünster, AUT)
-Mikrotiterplatten (schwarz, mit optischem Boden)	Thermo Scientific (Waltham, USA)
-Optische Petrischalen	MatTek, (Ashland, USA)
-Petrischalen	Greiner Bio One (Kremsmünster, AUT)
-Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
-Reaktionsgefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
-Rundboden-Polystyrolrohrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
-Serologische Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
-Spritzen	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA), Braun (Kronberg)
-Zellkulturflaschen	Corning (New York, USA), Greiner Bio One (Kremsmünster, AUT)
-Zellkulturplatten	Corning (New York, USA), Greiner Bio One (Kremsmünster, AUT)
-Zentrifugenrohrchen (15/50 ml)	Corning (New York, USA)

Einmal-Küvetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Insulinspritzen	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Kammerobjektträger	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Objektträger	Thermo Scientific (Waltham, USA), Carl Roth (Karlsruhe)
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Immobilon P: Cytiva (Freiburg)
Sterilfilter (0,45 µm, 0,20 µm)	Merck Millipore (Darmstadt)
Whatman Filterpapier	Carl Roth (Karlsruhe)
Zählkammer (KOVA® GLASSTIC®)	KOVA International (Amsterdam, NLD)
Zellsiebe (40, 70, 100 µm)	Greiner Bio One (Kremsmünster, AUT)

## 2.5 Molekulargewichtsstandards und Ladepuffer

Die in dieser Arbeit verwendeten Molekulargewichtsstandards und kommerziell erhältliche Ladepuffer sind Tabelle 2.5 zu entnehmen.

Tab. 2.5 Molekulargewichtsstandards und Ladepuffer

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Molekulargewichtsstandards - GeneRuler 1 kb plus DNA - GeneRuler 100 bp DNA	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DNA-Ladepuffer (6x)	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Protein-Molekulargewichtsstandard -Protein Marker IV	VWR/Peqlab (Radnor, USA)

## 2.6 Enzyme

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit eingesetzten Enzyme gelistet (Tabelle 2.6). Kommerziell erhältliche Enzyme wurden nach Herstellerangaben verwendet und mit entsprechenden Puffern versetzt.

Tab. 2.6 Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
<i>Antarctic Phosphatase</i>	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Collagenase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Dispase II	Roche (Basel, CHE)
DNase	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
β-Galaktosidase aus <i>Escherichia coli</i>	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
MangoTaq™ DNA-Polymerase	Bioline (London, GBR)
Q5® High-Fidelity DNA-Polymerase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
Proteinase K	Carl Roth (Karlsruhe)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
T4 Ligase	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

## 2.7 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sowie deren Anwendungsbereich und entsprechende Verdünnung sind Tabelle 2.7 zu entnehmen.

**Tab. 2.7 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper.** AF: Alexa Fluor, APC: Allophycocyanin, BV: Brilliant™ Violet, Cy: Cyanin, F: *Flow cytometry*, FITC: Fluoresceinisothiocyanat, HRP: *Horseradish peroxidase*, IB: Immunoblot, IF: Immunfluoreszenz-Färbung, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyll-Protein

Zielantigen/ Klon	Konjugat	Spezies	Hersteller	Anwendung	Verdünnung
<b>Primärantikörper</b>					
<b>Actin</b> Polyclonal	-	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	IB	1:1000
<b>CD24</b> (α-mouse) M1/69	APC	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:200
<b>CD29</b> (α-mouse/rat) HMβ1-1	Pacific Blue, PE-Cy7	Hamster	Biologend (San Diego, USA)	Fc Fc	1:200 1:500
<b>CD31</b> (α-mouse) 30-90	PE	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:500
<b>CD44</b> (α-human/mouse) IM7	PE-Cy7	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:2000
<b>CD45</b> (α-mouse) 30-F11	PE	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:1000
<b>CD49f</b> (α-human/mouse) GoH3	PE	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:500
<b>CD56</b> (α-human) NCAM16.2	BV421	Maus	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)	Fc	1:200
<b>CD61</b> (α-mouse) 2C9.G2 (HMβ3-1)	PerCP- Cy5.5	Hamster	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:500
<b>CD107a</b> (α- human) H4A3	PE, APC	Maus	Biologend (San Diego, USA)	Fc Fc	1:2000 1:2000
<b>CD117 (c-Kit)</b> (α-mouse) 2B8	APC-Cy7	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:200
<b>CD133</b> (α-mouse) 315-2C11	PE	Ratte	Biologend (San Diego, USA)	Fc	1:100
<b>CD140a</b> (α- mouse) APA5	PE	Ratte	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	Fc	1:200
<b>Cytokeratin 14</b> (α-human/mouse) EPR17350	-	Kaninchen	Abcam (Cambridge, GBR)	IF	1:200
<b>Cytokeratin 8 + 18</b> (α-human/mouse) Polyclonal	-	Meer- schweinchen	Abcam (Cambridge, GBR)	IF	1:50

<b>E-Cadherin</b> ( $\alpha$ -human/mouse) 24E10	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	IB IF	1:2000 1:200
<b>EpCAM</b> ( $\alpha$ -mouse) G8.8 ( $\alpha$ -human/mouse) Polyclonal	BV421, AF488 purified	Ratte  Kaninchen	Biolegend (San Diego, USA) Abcam (Cambridge, GBR)	Fc, IF Fc IB IF	1:100 1:100 1 $\mu$ g/ml 2 $\mu$ g/ml
<b>ErbB2</b> ( $\alpha$ -human) 24D2  MJD2	AF647, PE  -	Maus  Maus	Biolegend (San Diego, USA)  Invitrogen (Waltham, USA)	Fc IF Fc IB	1:100 1:100 1:100 1:1000
<b>FasL</b> ( $\alpha$ -human) NOK-1	PE	Maus	Biolegend (San Diego, USA)	Fc	1:100
<b><math>\gamma</math>-H2AX Phospho</b> ( $\alpha$ -human/mouse) Ser139	AF488	Maus	Biolegend (San Diego, USA)	IF	1:100
<b>H-2D<sup>b</sup></b> ( $\alpha$ -mouse) KH95	APC	Maus	Biolegend (San Diego, USA)	Fc	1:100
<b>H60a</b> ( $\alpha$ -mouse) REA556	APC	REA	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	Fc	1:100
<b>Ki67</b> ( $\alpha$ -mouse) 16A3	AF647	Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	Fc	1:100
<b>MULT1</b> ( $\alpha$ -mouse) 5D10	-	Hamster	Invitrogen (Waltham, USA)	Fc	1:100
<b>N-Cadherin</b> ( $\alpha$ -human/mouse) D4R1H	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	IB IF	1:1000 1:500
<b>p53</b> ( $\alpha$ -human/mouse) 1C12	-	Maus	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	IB IF	1:1000 1:1000
<b>p-Erk1/2</b> ( $\alpha$ -human/mouse) Polyclonal	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	IB	1:1000
<b>Phospho p-Erk1/2</b> ( $\alpha$ -human/mouse) E10	-	Maus	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	IB IF	1:1000 1:1000
<b>Rae-1</b> ( $\alpha$ -mouse) RAE723	FITC	REA	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)	IF	1:200
<b>Sca-1</b> ( $\alpha$ -mouse) D7	PE-Cy7	Ratte	Biolegend (San Diego, USA)	Fc	1:100
<b>TRAIL</b> ( $\alpha$ -human) RIK-2	APC	Maus	Biolegend (San Diego, USA)	IF	1:200
<b><math>\gamma</math>-Tubulin</b>	-	Kaninchen	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	IB	1:2000
<b>Vimentin</b> ( $\alpha$ -human/mouse) D21H3	-	Kaninchen	Cell Signaling Technology (Danvers, USA)	IB IF	1:1000 1:200
<b>ZEB1</b> ( $\alpha$ -human/mouse) Polyclonal	-	Kaninchen	Invitrogen (Waltham, USA)	IF	1:400

Sekundärantikörper					
<b>Maus IgG</b> -Polyclonal	AF488	Kaninchen	Invitrogen (Waltham, USA)	Fc	1:400
-Polyclonal	AF647	Kaninchen	Invitrogen (Waltham, USA)	Fc	1:400
-Polyclonal	HRP	Ziege	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	IB	1:16000
<b>Hamster IgG</b> -Polyclonal	PE	Ziege	Invitrogen (Waltham, USA)	Fc	1:200
<b>Meerschweinchen IgG</b> -Polyclonal	AF594	Ziege	Abcam (Cambridge, GBR)	IF	1:100
-Polyclonal	AF647	Ziege	Abcam (Cambridge, GBR)	IF	1:100
<b>Kaninchen IgG</b> -Polyclonal	AF405	Esel	Abcam (Cambridge, GBR)	IF	1:100
-Polyclonal	AF488	Ziege	Abcam (Cambridge, GBR)	IF	1:100
-Polyclonal	AF647	Ziege	Abcam (Cambridge, GBR)	Fc IF	1:400 1:100
-Polyclonal	HRP	Ziege	Invitrogen (Waltham, USA) Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	IB	1:16000

## 2.8 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.8 gelistet und wurden, wenn nicht anders beschrieben, nach Herstellerangaben angewendet.

Tab 2.8 Kits

Bezeichnung	Hersteller
<b>Kits zur Isolation und Aufreinigung von DNA</b>	
DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen (Hilden)
GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
NucleoBond® Xtra Maxi Kit	Machery-Nagel (Düren)
peqGOLD® Plasmid Miniprep Kit I	VWR/Peqlab (Radnor, USA)
<b>Sonstige Kits</b>	
eBioscience™ Foxp3/ Transcription Factor Staining Buffer Set	Invitrogen (Waltham, USA)
Fixation/Permeabilization Kit	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Galacto-Light Plus™ β-Galactosidase Reporter Gene Assay System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Venor®GeM Classic	Minerva Biolabs (Berlin)
NEBuilder HiFi DNA Assembly	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kit, 12 %	BioRad (Hercules, USA)

## 2.9 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten oder generierten Plasmide sind Tabelle 2.9 zu entnehmen.

Tab. 2.9 Plasmide

Bezeichnung	Eigenschaft	Referenz
M187 (pEF1 $\alpha$ -envMoMLV)	Retrovirales Verpackungsplasmid, welches für ein ecotropes Hüllprotein des murinen Leukämievirus (MLV) kodiert	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Stefan Stein
pCAG-loxPSTOPloxP-ZsGreen	Eukaryotisches Expressionsplasmid, dessen ORF aus dem Reporter gen ZsGreen und einer vorangeschalteten von LoxP-Sequenzen flankierten STOP-Kassette besteht	Addgene: #51269
pCAG-loxPSTOPloxP-ZsGreen-SV40-HygroR	Eukaryotisches Expressionsplasmid, dessen ORF aus dem Reporter gen ZsGreen und einer vorangeschalteten von LoxP-Sequenzen flankierten STOP-Kassette besteht und weiterhin für ein Hygromycin-Resistenzgen kodiert	In dieser Arbeit generiert
pCMV_ΔR8.91	Lentivirales Verpackungsplasmid, welches für Integrase, Reverse Transkriptase (RT), Polymerase (Pol) und Strukturproteine kodiert	(Zufferey <i>et al</i> , 1998)
pMD2.G	Lentivirales Verpackungsplasmid, welches für das Hüllprotein des <i>Vesicular stomatitis virus</i> (VSV-G) kodiert	(Zufferey <i>et al</i> , 1998)
pS-luc-V5-T2A-sfGFP-W	Lentivirales Transferplasmid, welches die simultane Expression der <i>Firefly</i> Luciferase (Luc) und des Reportergens sfGFP ermöglicht	(Zhou <i>et al</i> , 2015)
pS-ErbB2-W	Lentivirales Transferplasmid, welches für humanes ErbB2 codiert	In dieser Arbeit generiert
pS-ErbB2-Cre-W	Lentivirales Transferplasmid, welches die simultane Expression des humanen ErbB2 und der Cre-Rekombinase ermöglicht	In dieser Arbeit generiert
pRRLSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE	Lentivirales Transferplasmid, welches für das Enzym Cre-Rekombinase kodiert	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ernesto Bockamp
pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE	Lentivirales Transferplasmid, welches für GFP kodiert	Addgene: #12252

## 2.10 Oligonukleotide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide mit Sequenz und Verwendung aufgelistet. Lyophilisierte Oligonukleotide wurden mit ddH<sub>2</sub>O auf eine Stock-Konzentration von 100  $\mu$ M eingestellt und bei -20°C gelagert. Für die Herstellung der Arbeitskonzentration erfolgte eine 1:10 Verdünnung.

Tab. 2.10 Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Orientierung	Verwendung
<i>Trp53</i> <sup>D2.10</sup> 1F	CACAAAAACAGGTAAACCCAG	vorwärts	Detektion des von LoxP-Sequenzen flankierten und rekombinierten p53-Allels
<i>Trp53</i> <sup>D2.10</sup> 10R	GAAGACAGAAAAGGGGAGGG	rückwärts	Detektion des von LoxP-Sequenzen flankierten p53-Allels
<i>Trp53</i> <sup>F2.10</sup> 1R	AGCACATAGGAGGCAGAGAC	rückwärts	Detektion des rekombinierten p53-Allels
ErbB2 fl. rev.	ATGTATACTCACACTGGCAACGTCCAG	rückwärts	Klonierung von pS-ErbB2-W
ErbB2 fwd.	AAGAGCTCACAACCCCTCAC	vorwärts	Klonierung von pS-ErbB2-W
ErbB2 Seq. rev.	GAGAATTCAGACACCAACTC	rückwärts	Sequenzierung von pS-ErbB2-W/pS-ErbB2-Cre-W
ErbB2 Seq. fwd.	CCCTACAACCTTTCTACG	vorwärts	Sequenzierung von pSW-ErbB2/pSW-ErbB2-Cre
Fwd. ErbB2-full-length	GGGGATCTGTATCTCTGGCGGTCCC GCGGGCCACCATGGAGCTGGCGGCC TTGTG	vorwärts	Klonierung von pS-ErbB2-Cre-W
Rev. ErbB2-full-length	GTTAGGGGGGGGGAGGGAGAGG GGCCCCGCGGTACACTGGCACGTCC AGACCC	rückwärts	Klonierung von pS-ErbB2-Cre-W
NeoF_2B1	TGACCGCTCCTCGTGCTT	vorwärts	Detektion des <i>Kras</i> <sup>G12V</sup> -Allels (Genotypisierung)
Kras2F_16B5	CGTCCAGCGTGCCTAGACTTTA	vorwärts	Detektion des wildtypischen <i>Kras</i> -Allels (Genotypisierung)
Kras2r	ACTATTTCATACTGGGTCTGCCTT	rückwärts	Detektion des wildtypischen <i>Kras</i> - und <i>Kras</i> <sup>G12V</sup> -Allels (Genotypisierung)

## 2.11 Bakterienmedien und Antibiotika

Luria Bertani (LB)-Medium und -Agar wurden autoklaviert, auf ca. 50°C abgekühlt und anschließend mit Antibiotika versetzt.

Tab. 2.11 Bakterienmedien und Antibiotika

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
Luria Bertani (LB)-Medium	10 g Trypton 5 g NaCl 5 g Hefeextrakt in 1 l ddH <sub>2</sub> O
LB-Agar	LB-Medium 1,5 % (w/v) Agar-Agar
LB-Ampicillin-Agar	LB-Agar 100 µg/ml Ampicillin
LB-Ampicillin-Medium	LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin



LB-Kanamycin-Agar	LB-Agar 50 µg/ml Kanamycin
LB-Kanamycin-Medium	LB-Medium 50 µg/ml Kanamycin
SOC-Medium	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

## 2.12 Bakterienstämme

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Plasmid-Vervielfältigungen wurden verschiedene *E. coli* Stämme verwendet (Tab. 2.12). Dabei erfolgte die Transformation lentiviraler Transfer- oder Helferplasmide in Stbl3- und aller weiteren Konstrukte in Top10-Bakterien.

Tab. 2.12 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Quelle
<i>E. coli</i> Top10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ(araleu)7697 galU galK rpsL (Str <sup>R</sup> ) endA1 nupG	Invitrogen (Waltham, USA)
<i>E. coli</i> Stbl3	F <sup>+</sup> mcrB mrrhsdS20(r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) recA13 supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(Str <sup>R</sup> ) xyl-5 λ <sup>leumtl</sup> -1	Invitrogen (Waltham, USA)

## 2.13 Zellkulturmedien, Zusätze und rekombinante Proteine

Die Arbeit mit eukaryotischen Zellen wurde mit nachfolgenden Medien, Zusätzen und rekombinanten Proteinen durchgeführt (Tab.2.13).

Tab. 2.13 Zellkulturmedien, Zusätze und rekombinante Proteine

Bezeichnung	Zusammensetzung/Hersteller
<b>Basalmedien, rekombinante Proteine, Zusätze und Dissoziationsenzyme</b>	
Advanced DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
DMEM ( <i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i> )	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
EGF ( <i>Epidermal growth factor</i> )	PeproTech (Hamburg)
FGF ( <i>Fibroblast growth factor</i> )	PeproTech (Hamburg)
Fötales Kälberserum ( <i>Fetal bovine serum, FBS</i> )	Capricorn Scientific GmbH (Ebsdorfergrund)
L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Humanes Plasma (HP)	DRK/Blutspendedienst (Frankfurt am Main)
Insulin	Sigma Aldrich (Taufkirchen)
IL-2 (Proleukin®S)	Novartis Pharma GmbH (Nürnberg)
Opti-MEM	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
RPMI ( <i>Roswell Park Memorial Institute</i> )1640	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Penicillin/Streptomycin (100x)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Trypsin (0,05 und 0,25 %)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
TrypLE Express	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
X-Vivo 10	Lonza (Basel, CH)

<b>Kulturmedien</b>	
Advanced DMEM/F12 <sup>+++</sup> (mit Zusätzen)	Advanced DMEM/F12, 5 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup> (mit Zusätzen und Wachstumsfaktoren)	Advanced DMEM/F12 <sup>+++</sup> , 10 ng/ml EGF, 20 ng/ml FGF, 5 µg/ml Insulin
DMEM <sup>+++</sup> (mit Zusätzen)	DMEM, 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
RPMI <sup>+++</sup> (mit Zusätzen)	RPMI 1640, 10 % (v/v) FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin
X-Vivo <sup>+++</sup> (mit Zusätzen)	X-Vivo 10, 5 % (v/v) HP, 100 IU/ml IL-2
<b>Einfriermedien</b>	
Organoide	10 % (v/v) DMSO, 40 % (v/v) Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup> in FBS
NK-Zellen	10 % (v/v) DMSO in HP
Tumorzellen	10 % (v/v) DMSO in FBS

## 2.14 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen

Die in dieser Arbeit verwendeten und generierten eukaryotischen Zelllinien sind Tabelle 2.14 zu entnehmen. Zudem wurden murine Organoiden aus primären Epithelzellen und Tumoren generiert.

Tab. 2.14 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen

Zelllinie	Beschreibung	Kulturmedium	Referenz/ ATCC-Nr.
<b>Zelllinien</b>			
3T3	Murine embryonale Fibroblasten	DMEM <sup>+++</sup>	CRL-1658
3T3/ loxPSTOPlloxP- ZsGreen	Murine embryonale Fibroblasten, welche mit dem Cre-Rekombinase- Reporterkonstrukt pCAG-loxPSTOPlloxP-ZsGreen transfiziert wurden	DMEM <sup>+++</sup> + 500 µg/ml Hygromycin B	In dieser Arbeit generiert
4T1	Murines Mammakarzinom	DMEM <sup>+++</sup>	CRL-2539
A20	Murines B-Zell-Lymphom	RPMI <sup>+++</sup> + 0,05 (v/v) β-Mercapto- ethanol	TIB-208
B16F10	Murines Melanom	DMEM <sup>+++</sup>	CRL-6475
EL-4	Murines T-Zell-Lymphom	DMEM <sup>+++</sup>	TIB-39

HC11	Spontan immortalisierte murine Epithelzellen der Brustdrüse	RPMI <sup>+++</sup>	CRL-3062
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen, welche das große T-Antigen von SV40 exprimieren	DMEM <sup>+++</sup>	CRL-11268
HEK293T/ loxPSTOPlloxP- ZsGreen	Humane embryonale Nierenzellen, welche mit dem Cre-Rekombinase-Reporterkonstrukt pCAG-loxPSTOPlloxP-ZsGreen transfiziert wurden	DMEM <sup>+++</sup> + 500 µg/ml Hygromycin B	In dieser Arbeit generiert
HEK293T/17	Einzelklon der HEK293T-Zelllinie, welcher eine hohe Transfizierbarkeit aufweist	DMEM <sup>+++</sup>	CRL-11268
K562	Humane chronisch-myeloische Leukämie (CML)	RPMI <sup>+++</sup>	CCL-243
K562/luc2-sfGFP	Humane CML-Zellen, welche luc und sfGFP exprimieren	RPMI <sup>+++</sup>	In dieser Arbeit generiert
MDA-MB453	Humanes Mammakarzinom	DMEM <sup>+++</sup>	HTB-131
MDA-MB468	Humanes Mammakarzinom	DMEM <sup>+++</sup>	HTB-132
NK-92	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom	X-Vivo <sup>++</sup>	CRL-2407
NK-92/5.28.z	Humanes Non-Hodgkin-Lymphom; modifiziert mit ErbB2-spezifischem CAR (5.28.z)	X-Vivo <sup>++</sup>	(Schönfeld <i>et al</i> , 2015)
LC-6	Murines Lungenkarzinom, isoliert aus Tamoxifen-behandelten CKP-Mäusen und subkutan <i>in vivo</i> passagiert	DMEM <sup>+++</sup>	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ernesto Bockamp
Renca	Murines Nierenzellkarzinom	RPMI <sup>+++</sup>	CRL-2947
Renca-LacZ	Murines Nierenzellkarzinom mit LacZ-Expression	RPMI <sup>+++</sup> +250 µg/ml Zeocin	(Maurer-Gebhard <i>et al</i> , 1998)
<b>Langzeitkulturen/Organoide</b>			
CKP (p53 <sup>fl/fl</sup> / LSL-Kras <sup>G12V</sup> )	Murine Brustepithel-Organoide aus CKP-Mäusen	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP/luc2-GFP (p53 <sup>fl/fl</sup> / LSL-Kras <sup>G12V</sup> )	Murine Brustepithel-Organoide, welche luc und sfGFP exprimieren	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-Cre (p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> )	Murine Brustepithel-Organoide, modifiziert mit Cre-Rekombinase	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-Cre/luc2- GFP (p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> )	Murine Brustepithel-Organoide, modifiziert mit Cre-Rekombinase sowie luc und sfGFP	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2 (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> / Kras <sup>G12V</sup> )	Murine Brustepithel-Organoide, modifiziert mit ErbB2 und Cre-Rekombinase	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ luc2-GFP (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> / Kras <sup>G12V</sup> )	Murine Brustepithel-Organoide, modifiziert mit ErbB2 und Cre-Rekombinase sowie luc und sfGFP	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert

CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 1.1-1.5	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche <i>in vivo</i> passagiert wurden (NSG-Mäuse)	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 2.1-2.5	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche zweifach <i>in vivo</i> passagiert wurden (NSG-Mäuse)	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 2.2 EpCAM <sup>-/low</sup>	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche zweifach <i>in vivo</i> passagiert (NSG-Mäuse) und auf EpCAM <sup>-/low</sup> -exprimierende Zellen angereichert wurden	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 2.2 EpCAM <sup>-/low</sup> / luc2-sfGFP	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche zweifach <i>in vivo</i> passagiert (NSG-Mäuse), auf EpCAM <sup>-/low</sup> -exprimierende Zellen angereichert und mit luc und sfGFP modifiziert wurden	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 2.2 EpCAM <sup>high</sup>	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche zweifach <i>in vivo</i> passagiert (NSG-Mäuse) und auf EpCAM <sup>high</sup> -exprimierende Zellen angereichert wurden	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 2.2 EpCAM <sup>high</sup> / luc2-sfGFP	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche zweifach <i>in vivo</i> passagiert (NSG-Mäuse), auf EpCAM <sup>high</sup> -exprimierende Zellen angereichert und mit luc und sfGFP modifiziert wurden	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 3.1-3.5 EpCAM <sup>-/low</sup>	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche auf EpCAM <sup>-/low</sup> -exprimierende Zellen angereichert und dreifach <i>in vivo</i> passagiert wurden (NSG-Mäuse)	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert
CKP-ErbB2/ <i>in vivo</i> Passage 3.1-3.4 EpCAM <sup>high</sup>	Murine Brustepithel-Organoiden (ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> ), welche auf EpCAM <sup>high</sup> -exprimierende Zellen angereichert und dreifach <i>in vivo</i> passagiert wurden (NSG-Mäuse)	Advanced DMEM/F12 <sup>++++</sup>	In dieser Arbeit generiert

## 2.15 Mausstämme

Die nachfolgende Tabelle listet die in dieser Arbeit verwendeten Mauslinien.

Tab. 2.1.15 Mauslinien

Linie	Quelle
C57BL/6	Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld)
NOD-SCID IL-2R $\gamma^{\text{null}}$ (NOD.Cg-Prkdc <sup>scid</sup> /J2rg <sup>tm1Wjl</sup> /SzJ; NSG)	Georg-Speyer-Haus, Eigenzucht
CC10-CreERT2Kras <sup>LSLG12Vgeo/WT</sup> Trp53 <sup>fl/fl</sup> (CKP)	Georg-Speyer-Haus, Eigenzucht (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Ernesto Bockamp)

## 2.16 Software

Die in dieser Arbeit verwendete Software ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen.

Tab. 2.1.16 Software

Bezeichnung	Hersteller
Adobe Illustrator	Adobe Systems (San José, USA)
Axiovision	Zeiss (Oberkochen)
CQ1 Software	Yokogawa (Musashino, JPN)
FlowJo	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
GraphPad Prism	GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA)
Image J	National Institutes of Health (Bethesda, USA)
ImarisViewer	Oxford Instruments (Abingdon, GBR)
ImarisFileConverter	Oxford Instruments (Abingdon, GBR)
SnapGene Viewer	Biotech LLC (Chicago, USA)
Microsoft Office	Microsoft (Redmond, USA)
QuPath	University of Edinburgh (Edinburgh, GBR)
Zotero	Center for History and New Media (Fairfax County, USA)

## 3. Methoden

### 3.1 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1.1 Isolation von DNA

Zur Extraktion von Nukleinsäuren müssen die Zellen zunächst lysiert bzw. deren Zellmembran aufgebrochen werden. Dies kann beispielsweise durch eine alkalische Lyse oder mit Hilfe von Detergenzien erfolgen. Optional können Nukleinsäuren anschließend über ein Säulensystem aufgereinigt oder durch Ethanol gefällt werden. In dieser Arbeit wurde DNA aus Zellsuspensionen, Geweben oder aus Bakterien isoliert.

##### 3.1.1.1 Gewebe und Zellsuspensionen

Lyse-Puffer: 5 mM EDTA, 200 mM NaCl, 0,2 % SDS, 100 mM Tris (pH 8,5) in ddH<sub>2</sub>O  
Proteinase K: 20 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

DNA aus Zellsuspensionen wurde mit Hilfe des *DNeasy Blood & Tissue Kits* isoliert. Die Isolation erfolgte gemäß der Herstellerangaben. Aufgereinigte DNA wurde in zweifach destilliertem Wasser (ddH<sub>2</sub>O) eluiert.

Für die Genotypisierung von Mäusen wurde DNA aus Ohrbiopsien extrahiert. Dafür wurden Ohrstanzproben mit 45 µl Lyse-Puffer und 5 µl Proteinase K versetzt. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 56 °C erfolgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase K durch eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C. Die Proben wurden nachfolgend mit 200 µl ddH<sub>2</sub>O versetzt, Zelltrümmer wurden durch eine 15-minütige Zentrifugation bei 1300 rpm sedimentiert und der DNA enthaltende Überstand wurde in einem neuen Reaktionsgefäß gesammelt.

##### 3.1.1.2 Bakterien

Die Extraktion von DNA aus Bakterienzellen diente der Plasmidpräparation. Dafür wurden Bakterienzellen aus Übernachtflüssigkulturen präzipitiert und anschließend durch eine alkalische Lyse aufgeschlossen. Die Aufreinigung kleinerer DNA-Mengen zur Analyse von Bakterienklonen wurde mit Hilfe des *peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Plasmid-DNA wurde nachfolgend im Zuge eines analytischen Restriktionsverdaus und einer Sequenzierung untersucht. Nach Validierung des Plasmids erfolgte die Präparation größerer DNA-Mengen mit hohem Reinheitsgrad unter Verwendung des *NucleoBond® Xtra Maxi Kits* nach Herstellerangaben.

### 3.1.2 Die Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl., *Polymerase chain reaction*, PCR) dient der Vervielfältigung und Analyse von DNA. Komplementäre Oligonukleotide (Primer) binden dabei an denaturierte DNA (Template) und dienen als Ausgangspunkt der Reaktion. Eine thermostabile Polymerase kann nachfolgend den komplementären DNA-Strang synthetisieren, sodass unter Verwendung spezifischer Primer und unter Bereitstellung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) gewünschte DNA-Abschnitte *in vitro* amplifiziert werden können. Die PCR erfolgte für die Genotypisierung von Mäusen (siehe Abschnitt 3.8.2), die Amplifikation sowie Modifikation von *Inserts* für die Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA und zur Detektion von Mykoplasmen. Für den Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte wurde eine *Taq*-Polymerase (Mango*Taq*<sup>TM</sup> DNA-Polymerase) verwendet, während PCR-Produkte zur Herstellung rekombinanter Plasmid-DNA mit Hilfe der Q5 *High-Fidelity* DNA-Polymerase amplifiziert wurden. Grundsätzlich wurden PCRs mit den nachfolgenden Komponenten angesetzt:

Tab. 3.1 Pipettierschema einer PCR unter Verwendung der Q5- oder einer *Taq*-Polymerase

Komponente	Menge (Q5-Polymerase)	Menge ( <i>Taq</i> -Polymerase)
DNA (Template)	100 pg-10 ng	2-5 µl der DNA-Lösung
<i>Forward</i> -Primer (10 µM)	1,25 µl	1-2,5 µl
<i>Reverse</i> -Primer (10 µM)	1,25 µl	1-2,5 µl
dNTPs (1 mM)	1 µl	12,5 µl des 2x Mango-Mix (Polymerase, dNTPs, Reaktionspuffer)
Reaktionspuffer	5 µl	
Polymerase	0,25 µl	
ddH <sub>2</sub> O	Auf 25 µl auffüllen	

Die Amplifikation wurde im Biometra® T3000- oder Biometra® TGradient-Thermocycler mit folgenden Programmen durchgeführt:

Tab. 3.2 Thermocycler-Protokoll einer PCR unter Verwendung der Q5- oder einer *Taq*-Polymerase

Schritt	Temperatur (Q5)	Dauer (Q5)	Temperatur ( <i>Taq</i> )	Dauer ( <i>Taq</i> )	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	98 °C	30 s	95 °C	5 min	1
Amplifikation	Denaturierung	98 °C	95 °C	30 s	30
	Hybridisierung	50-65 °C	50-65 °C	30 s	
	Elongation	72 °C	30 s/kb	72 °C	
Finale Elongation	72 °C	5 min	72 °C	5 min	1

Bis zur weiteren Verwendung wurden die PCR-Produkte bei 4 °C aufbewahrt. Zur Analyse und Aufreinigung von PCR-Produkten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt.

### 3.1.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und die Überprüfung des Reinheitsgrades erfolgten durch eine photometrische Messung mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop™ 1000. Dieses ermittelt die Absorption bei 260 nm und bestimmt somit die Konzentration von Nukleinsäuren. Die Reinheit der DNA-Proben wurde dabei durch zusätzliche Bestimmung der Absorption bei einer Wellenlänge von 230 nm und 280 nm analysiert. Das Absorptionsverhältnis reiner DNA-Lösungen weist einen 260/230-Wert größer als 2,0 und einen 260/280-Wert zwischen 1,8 und 2,0 auf.

### 3.1.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

Ethidiumbromidlösung (1 %)	Carl Roth (Karlsruhe)
Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer (50x):	50 mM EDTA, 1 M Eisessig, 2 M Tris in ddH <sub>2</sub> O

Zur Größenbestimmung von DNA-Molekülen sowie zur Aufreinigung spezifischer DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dabei wurden DNA-Moleküle in einem Trägersystem und unter Ausbildung eines elektrischen Feldes in Abhängigkeit von ihrer Größe und der damit einhergehenden proportionalen Anzahl negativer Ladungen aufgetrennt. Dies erfolgte in Horizontalgel-Apparaturen und unter Verwendung von 1-3%igen Agarose-Gelen. Zur Herstellung der Gele wurde die Agarose mit 1x TAE-Puffer versetzt und in einer Mikrowelle aufgeköcht. Die Zugabe von Ethidiumbromid (1:10000) ermöglicht eine nachfolgende Visualisierung der Nukleinsäuren. Die DNA-Proben wurden mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung der DNA-Moleküle wurde zudem ein Molekulargewichtsstandard aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80-120 Volt durchgeführt. Im Anschluss erfolgte die Dokumentation und Analyse der Agarose-Gele mit Hilfe von UV-Licht unter Verwendung des Fusion Fx7-Geräts.

#### 3.1.4.1 Analytische Gelelektrophorese

Eine analytische Gelelektrophorese erfolgte wie in Abschnitt 3.1.4 beschrieben und diente der Untersuchung von DNA-Molekülen wie beispielsweise dem Nachweis spezifischer DNA-Abschnitte nach PCR-Amplifikation sowie der Validierung von Plasmid-DNA, welche nach Spaltung mit Restriktionsenzymen spezifische Bandenmuster aufweist.

#### 3.1.4.2 Präparative Gelelektrophorese

Spezifische Fragmente wurden mit Hilfe einer präparative Gelelektrophorese aus einem DNA-Gemisch isoliert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das gewünschte DNA-Fragment anhand der Größe identifiziert und mit einem Skalpell aus dem Gel entfernt. Die Aufreinigung der Nukleinsäure aus



dem Gel erfolgte unter Verwendung des *GeneJet Gel Extraction Kits* gemäß der Herstellerangaben. Die DNA wurde in 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert.

### 3.1.5 Restriktionsenzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsenzyme ermöglichen es, DNA-Doppelstränge zu spalten. Hierbei erkennen Restriktionsendonukleasen definierte, zumeist palindromische Sequenzabschnitte. Die Hydrolyse der DNA findet abhängig vom eingesetzten Enzymen innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz statt und erzeugt dabei glatte (*blunt*) oder überhängende (*sticky*) Enden. Der Restriktionsverdau von DNA wurde zur Erzeugung rekombinanter Plasmid-DNA (präparativer Restriktionsverdau) oder zur Analyse von DNA-Molekülen (analytischer Restriktionsverdau) verwendet.

Die Validierung von Plasmid-DNA im Zuge einer analytischen Restriktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Dabei wurden 0,5-1 µg DNA mit 1 Unit des entsprechenden Enzyms versetzt und anschließend für mindestens 1 h bei 37 °C inkubiert. Der präparative Restriktionsverdau erfolgte mit 3-10 µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkten, die entsprechend ihrer Konzentration mit Restriktionsnukleasen (1 Unit/ 1 µg DNA) versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 30-50 µl aufgefüllt wurden. Dabei erfolgte der Pufferzusatz nach Herstellerangaben. Sofern kein Puffer die optimale Effizienz eines Doppelverdaus gewährleisten konnte, wurde die Restriktion in sequenziellen Schritten mit zwischengeschalteter DNA-Aufreinigung (*GeneJet Gel Extraction Kit*) durchgeführt. Um eine Rezirkularisierung geschnittener Plasmid-DNA zu verhindern, wurde der Restriktionsansatz 30 min vor Beendigung mit *Antarctic Phosphatase* (5 Units/ 1 µg DNA) versetzt. Verdaute DNA-Moleküle wurden mit Hilfe einer präparativen Gelelektrophorese extrahiert oder mittels analytischer Gelelektrophorese analysiert.

### 3.1.6 Ligation von DNA-Molekülen

Während der Ligation werden doppelsträngige DNA-Fragmente mit kompatiblen Enden unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung verknüpft. Die Ligation wurde durchgeführt, um DNA-Fragmente (*Inserts*) in ein durch Verdau mit Restriktionsenzymen linearisiertes Plasmid-*backbone* zu integrieren, und diente somit der Generierung rekombinanter DNA-Moleküle. Die Reaktion unter Verwendung der T4-Ligase wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Um die Effizienz der Ligation zu steigern, wurde ein molarer Überschuss des *Inserts* verwendet, der in der Regel der zwei- bis dreifachen Menge des Plasmid-*backbones* entsprach und mit Hilfe folgender Formel berechnet wurde:

$$\frac{\text{Plasmid-DNA (ng)} \times \text{Insert (bp)}}{\text{Plasmid-DNA (bp)}} \times \text{molares Verhältnis (Insert/Plasmid-DNA)} = \text{Insert (ng)}$$

Der Ligationsansatz wurde für 2-4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 16 °C inkubiert. Es folgte die Transformation in chemisch kompetente Bakterien.

### 3.1.7 Erzeugung rekombinanter Plasmid-DNA mittels *Gibson Assembly*

Im Zuge des *Gibson Assembly* mit Hilfe des *NEBuilder*-Systems können mehrere DNA-Fragmente ohne vorherigen Restriktionsverdau ligiert werden. Für einen effizienten Zusammenbau müssen die dafür vorgesehenen DNA-Moleküle eine etwa 25-30 bp lange homologe Sequenz zu dem jeweilig benachbarten DNA-Fragment aufweisen. In einer isothermalen Reaktion werden mittels Exonuklease am 3'-Ende der DNA einzelsträngige Überhänge generiert, sodass homologe Sequenzen der verschiedenen DNA-Fragmente hybridisieren können. Fehlende Nukleotide werden von einer Polymerase aufgefüllt und die zusammengelagerten DNA-Stränge mit Hilfe einer Ligase verknüpft.

Das *Gibson Assembly* wurde in dieser Arbeit verwendet, um ein mittels PCR amplifiziertes DNA-Fragment in ein linearisiertes Plasmid-*backbone* zu integrieren. Dafür wurden mit Hilfe von Oligonukleotiden zum Vektor kompatible Überhänge generiert. Das aufgereinigte PCR-Produkt und das linearisierte Plasmid-*backbone* wurden nachfolgend mit dem *NEBuilder Hifi DNA Assembly Master Mix* versetzt. Die eingesetzte Konzentration der DNA-Moleküle folgte dabei den Herstellerempfehlungen. Die Proben wurden für 1 h bei 50 °C inkubiert und anschließend für die Transformation in Bakterien verwendet.

### 3.1.8 Herstellung chemisch kompetenter Bakterien

- Transformationspuffer I: 100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM KAc, 10 mM CaCl<sub>2</sub>,  
13 % (v/v) Glycerin in ddH<sub>2</sub>O (pH 5,8 eingestellt mit Eisessig)
- Transformationspuffer II: 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MOPS (pH 7,0), 10 mM RbCl,  
13 % (v/v) Glycerin in ddH<sub>2</sub>O (pH 7 eingestellt mit NaOH)

Für die Herstellung chemisch kompetenter Zellen wurden Bakterien (Stbl3, Top10) auf LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die gebildeten Kolonien dienten nachfolgend für die Herstellung einer Übernachtsflüssigkultur, für welche 10 ml LB-Medium mit einem Einzelklon angeimpft wurden. Nach 12- bis 14-stündiger Kultivierung in einem Schüttelinkubator wurden 600 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 6 ml der Vorkultur versetzt. Es folgte eine weitere Inkubation bei 37 °C, bis die Bakteriensuspension eine optische Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,5-0,6 erreicht hatte. Um eine hohe Viabilität der Zellen zu gewährleisten, erfolgten alle nachfolgenden Schritte auf Eis und unter der Verwendung gekühlter Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße. Die Bakteriensuspension wurde zunächst für 20 min auf Eis inkubiert und dann durch 15-minütiges Zentrifugieren (3000 rpm, 4 °C) pelletiert. Anschließend wurden die Bakterien in 200 ml eiskaltem Transformationspuffer I resuspendiert, für 2 h

auf Eis inkubiert, erneut für 15 min abzentrifugiert (3000 rpm, 4 °C) und in 15 ml Transformationspuffer II aufgenommen. Je 50-100 µl der Bakteriensuspension wurden in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Um die Transformationseffizienz der hergestellten chemisch kompetenten Zellen zu ermitteln, wurden schockgefrorene Aliquots mit 10 pg, 100 pg und 1 ng Plasmid-DNA (*High copy number* Plasmid) transformiert (siehe 3.1.9) und über Nacht auf antibiotikahaltigen-LB-Platten kultiviert. Die Transformationsrate wurde am nächsten Tag durch das Auszählen der gewachsenen Kolonien (engl., *Colony forming unit*, CFU) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Transformationsrate} \left( \frac{\text{CFU}}{\mu\text{g}} \right) = \frac{V(\text{total})}{V(\text{ausplattiert})} \times \frac{\text{Anzahl der Kolonien}}{\text{eingesetzte DNA} (\mu\text{g})}$$

### 3.1.9 Transformation von *E coli* mit rekombinanter DNA

Durch das Einschleusen rekombinanter DNA in kompetente Bakterien (Transformation) kann Plasmid-DNA vervielfältigt werden. Die Transformation von DNA-Konstrukten mit *Long terminal repeat* (LTR)-Sequenzen erfolgte in den rekombinationsdefizienten Stbl3-Bakterienstamm, während alle weiteren Transformationen mit Top10-Bakterien durchgeführt wurden. Dafür wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 0,1-1 ng Plasmid-DNA oder 10-20 µl eines Ligations- bzw. *Gibson Assembly*-Ansatzes versetzt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis und ein einminütiger Hitzeschock bei 42 °C. Die Zellen wurden nachfolgend wieder für weitere 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 300 µl LB- oder SOC-Medium versetzt. Dann wurden die Zellen für 30-45 min bei 37 °C geschüttelt, sodass die über das eingeschleuste Plasmid vermittelte Antibiotikaresistenz ausgebildet werden konnte. Der Transformationsansatz wurde nachfolgend auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotika-Zusatz ausplattiert, die Platten wurden für 12-16 h bei 37 °C inkubiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4 °C gelagert.

### 3.1.10 Sequenzierung von DNA

Die Validierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels Sequenzierung durch den externen Sequenzierservice der Firma Eurofins Genomics. Die Sequenzanalyse wurde mit Hilfe des NCBI *DNA-Alignment Tools* ("Nucleotide BLAST") durchgeführt, wobei die Sequenzierungsergebnisse mit Referenz-Sequenzen *in silico* generierter Plasmide abgeglichen werden können.

## 3.2 Proteinbiochemische Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Zelllysaten

<i>Radioimmunoprecipitation assay</i> (RIPA)-Puffer:	5 mM EDTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris HCL (pH 7,5), 0,5 % (w/v) Na-Desoxychelate, 0,1 % (w/v) SDS, 1 % (v/v) NP-40 in ddH <sub>2</sub> O
7x <i>Complete Protease</i> -Inhibitor:	1 Tablette in 1,5 ml ddH <sub>2</sub> O
10x <i>PhosSTOP Phosphatase</i> -Inhibitor:	1 Tablette in 1 ml ddH <sub>2</sub> O

Für die Präparation von Protein-Lysaten aus eukaryotischen Zellen wurden  $1 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  Zellen gesammelt und zweimal mit DPBS gewaschen. Um die Degradierung der Proteine zu minimieren, erfolgten alle nachfolgenden Schritte auf Eis. Das Zellpellet wurde in 50-150  $\mu$ l gekühltem RIPA-Puffer resuspendiert, der für die Analyse phosphorylierter Proteine mit 1/10 (v/v) *PhosSTOP Phosphatase*-Inhibitor und für alle weiteren Analysen mit 1/7 (v/v) *Complete Protease*-Inhibitor versetzt wurde. Es folgte eine 30-minütige Inkubation und die Sedimentierung von Zelltrümmern durch eine 10-minütige Zentrifugation (1400 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und entweder direkt für weitere Analysen verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen in Zelllysaten erfolgte durch eine kolorimetrische Messung im Zuge eines Bradford-Assays. Das Assay beruht auf der Komplexbildung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue* mit kationischen und unpolaren Aminosäuren und der damit einhergehenden Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm kann photometrisch ermittelt werden und ist direkt proportional zu der in der Lösung befindlichen Proteinkonzentration.

Für die Durchführung des Bradford-Assays wurde zunächst das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:5 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Anschließend wurde je 1 ml der Lösung in Küvetten überführt und mit 1  $\mu$ l der Protein-Lösung oder des verwendeten RIPA-Puffers (Referenz) versetzt. Nach 5-minütiger Inkubation erfolgte die photometrische Absorptionsbestimmung bei 595 nm mit Hilfe des Evolution 60 Photometers.

### 3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung:	10 % (w/v) APS in ddH <sub>2</sub> O
5x Laemmli-Puffer:	50 mM Tris HCl (pH 6,8), 10 % (v/v) Glycerol, 2 % (w/v) SDS, 0,1 % Bromphenolblau in ddH <sub>2</sub> O
5x Laemmli-Puffer für reduzierende Bedingungen:	3 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol in Laemmli-Puffer
SDS ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )-Laufpuffer:	250 mM Glycin, 24 mM Tris, 0,1 % (w/v) SDS in ddH <sub>2</sub> O (pH 8,3)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine in Abhängigkeit von ihrer Molekülmasse aufgetrennt werden. Durch das Aufkochen der Proben und die Behandlung mit  $\beta$ -Mercapthoethanol werden die Proteine zunächst denaturiert. Darüber hinaus werden Proteine durch die Zugabe von SDS in ihrer Eigenladung überdeckt und proportional zu ihrer molekularen Masse negativ geladen. Die Auftrennung im elektrischen Feld des Gels erfolgt anschließend anhand der relativen Molekülmasse.

Die Herstellung diskontinuierlicher SDS-Gele erfolgte mit Hilfe des *TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kits* (12 %, Bio-Rad) nach folgender Zusammensetzung:

**Tab. 3.3 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel** unter Verwendung des *TGX Stain-Free™ FastCast™ Acrylamide Kits*

Komponente	Trenngel	Sammelgel
Lösung A	4 ml	1,5 ml
Lösung B	4 ml	1,5 ml
10 % APS	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	4 $\mu$ l

Zur Vorbereitung der Proben wurden 20-25  $\mu$ g gelöstes Protein mit 1/5 (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanolhaltigem Laemmli-Puffer versetzt und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 25  $\mu$ l aufgefüllt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95 °C wurden die Proben abzentrifugiert und die Überstände zusammen mit einem Molekulargewichtsstandard auf das Gel aufgetragen. Nach Befüllen der Kammer mit SDS-Laufpuffer erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 10 mA und einer Spannung von 200-300 V.

### 3.2.4 Immunoblot-Analyse (Western blot)

TBS-T: 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0,05 % (v/v) TWEEN in ddH<sub>2</sub>O (pH 7,8)

*Blocking*-Puffer: 5 % (w/v) Magermilchpulver oder 5 % (w/v) BSA in TBS-T

Transfer-Puffer: 200 ml Trans-Blot 5x Transfer-Puffer, 200 ml EtOH, 600 ml ddH<sub>2</sub>O

Mit Hilfe der Immunoblot-Technik können spezifische Proteine in einem Proteingemisch analysiert werden. Dafür werden die durch eine Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran immobilisiert und können nachfolgend durch Antikörper detektiert werden. Der Transfer der Proteine erfolgte dabei über das *Semi-Dry*-Verfahren. Der Aufbau des Blots umfasste zwei Lagen Whatman-Filterpapier getränkt in Transfer-Puffer, eine durch Ethanol aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel und zwei weitere Lagen Whatman-Filterpapier. Die Proteine wurden mit Hilfe des Trans-Blot Turbo Systems auf die Membran übertragen. Dabei wurde in Abhängigkeit von den zu detektierenden Proteinen die vorinstallierten Programme für Proteine mit gemischter oder hoher molekularer Masse gewählt (2,5 A, 25 V, 5-10 Minuten). Nach dem Proteintransfer wurden unspezifische Bindestellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation in Blockierlösung abgesättigt. Es folgte die Inkubation mit dem Primäantikörper, welcher in Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4 °C auf dem Rollenmischer mit der Membran inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBS-T-Puffer gewaschen und anschließend für 1 h mit Sekundäantikörper auf dem Rollenmischer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T-Puffer folgte die Detektion der an den Sekundäantikörper gekoppelten HRP (*Horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase), die nach Zugabe des Substrats ECL (*Enhanced chemiluminescence*) Licht emittiert, welches mittels Röntgenfilm oder Chemilumineszenz-Messung am Fusion Fx7 visualisiert wurde.

### 3.3 Zellkulturmethoden

Die Kultivierung der in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien und primären Zellen erfolgte unter Wasserdampfsättigung bei einer konstanten Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden dabei unter aseptischen Bedingungen in Sicherheitswerkbänken und unter Verwendung steriler Materialien, Medien, Lösungen und Puffer durchgeführt. Die verwendeten Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf eine Mykoplasma-Kontamination untersucht. Um eine Ansammlung geno- und phänotypischer Veränderungen von Zell- und Langzeitkulturen zu vermeiden, wurden diese nicht länger als 3-4 Monate kultiviert und dann durch frühere Passagen ersetzt.

### 3.3.1 Kultivierung und Passagieren von Säugetierzellen in 2D-Kulturen

Die Kultivierung von humanen und murinen Zelllinien erfolgte in sterilen Gewebekulturflaschen, Zellkulturschalen oder in Well-Platten unter Verwendung der in Tabelle 2.1.13 aufgeführten Kulturmedien. In Abhängigkeit von der Expansionsrate wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 60-80 % passagiert. Zum Ernten oder Subkultivieren adhärenter Zelllinien wurde das Medium entfernt, die Zellen wurden mit 1x DPBS gewaschen und anschließend mittels enzymatischer Dissoziation vereinzelt und in Suspension gebracht. Stark adhärente Zellen wurden dafür mit 0,25%igem Trypsin behandelt, während semi-adhärenente Zellen in 0,05%igem Trypsin inkubiert wurden. Die Inaktivierung von Trypsin und das Vereinzeln der Zellen erfolgte durch die Zugabe von serumhaltigem Kulturmedium und mehrmaligem Abspülen des Gefäßbodens. Aus Organoiden abgeleitete 2-D-Kulturen wurden mit Hilfe von TrypLE Express dissoziiert, welches durch 1-2-maliges Waschen mit Kulturmedium oder 1x DPBS aus der Zellsuspension verdünnt wurde. Die so generierten Zellsuspensionen wurden nachfolgend für weitere Applikationen gesammelt oder zum Subkultivieren in gewünschter Verdünnung erneut in Kulturgefäße ausgesät. Suspensionszellen wurden durch mehrmaliges Resuspendieren vereinzelt, anschließend direkt verwendet oder zum Passagieren mit Kulturmedium verdünnt und weiter kultiviert.

### 3.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Säugetierzellen in 2D-Kulturen

Zur Langzeitlagerung etablierter Zelllinien wurden diese kryokonserviert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen geerntet und durch eine 3-minütige Zentrifugation bei 1300 rpm sedimentiert. Die Zellen wurden in kaltem DMSO-haltigen Einfriermedium aufgenommen, auf eine Dichte von  $1 \times 10^6$ - $4 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und nachfolgend in Kryokonservierungsröhrchen überführt. Zum schonenden Einfrieren der Zellen wurden die Kryokonservierungsröhrchen in speziellen Einfrierbehältern (Mr. Frosty/CoolCell LX) mit einer Abkühlungsrate von 1 °C/min auf -80°C gekühlt und anschließend für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und zügig mit vorgewärmtem Kulturmedium versetzt. Zum Ausverdünnen des zelltoxischen Einfriermediums wurden die Zellen ein- bis zweimal gewaschen und anschließend in Kulturflaschen ausgesät. Nach 24 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellkultur wie unter 3.3.1.1 beschrieben fortgeführt.

### 3.3.3 Kultivierung von Säugetierzellen in 3D-Kulturen

Die Kultivierung von Organoiden erfolgte in einer Basalmembranmatrix aus Matrigel, welches zahlreiche extrazelluläre Matrixproteine wie beispielsweise Laminin oder Kollagen enthält. Zur Generierung von Organoiden aus Epithelzellen der Brustdrüse wurde Brustfettgewebe von C57BL/6- oder CKP-Mäusen

verwendet. Frühe Passagen (Passage 5-9) reiner Epithelzellkulturen und modifizierter Derivate dienten zur Herstellung einer Masterzellbank, sodass Organoid-Langzeitkulturen nach 3-4 Monaten durch frühere Passagen ausgetauscht werden konnten.

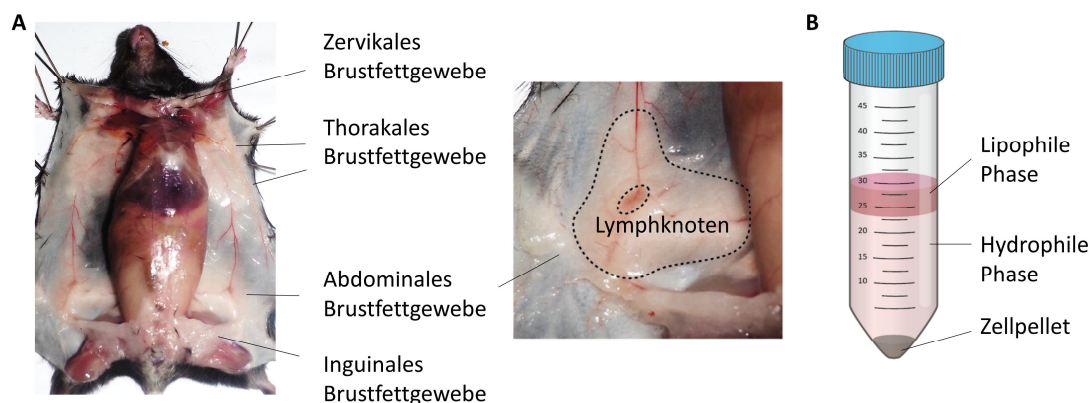
### 3.3.3.1 Etablierung von Organoiden des Brustepithels

Collagenase-Lösung (Stock): 20 mg/ml bzw. 2500 U/ml in DPBS

DNase-Lösung (Stock): 1 mg/ml bzw. 2000 U/ml in RPMI

Dissoziationslösung: 50 U/ml Collagenase +/- 20 U/ml DNase in Advanced DMEM/12

Für die Etablierung muriner Organoiden des Brustdrüsenepithels wurden 6-12 Wochen alte weibliche Mäuse unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Nach Eröffnen der Haut wurden die abdominalen Brustfettpolster isoliert und der darin enthaltene Lymphknoten wurde entfernt (siehe Abb. 3.1 A). Das verbleibende Fettgewebe wurde mit Hilfe einer Schere oder eines Skalpells in feine Stücke zerkleinert und anschließend in 5 ml frisch angesetzter Collagenase-haltiger Dissoziationslösung unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Vereinzelung der Zellen wurde dabei alle 20 min durch Auf- und Abpipettieren und die damit einhergehende mechanische Dissoziation gefördert. Nach 45-60 min erfolgte die Zugabe von DNase und eine weitere Inkubation für 20 min bei 37 °C unter Schütteln. Die Zellsuspension wurde nachfolgend in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt, mit 20 ml FBS-haltigem Medium versetzt und bei 1500 rpm zentrifugiert. Anschließend konnte eine lipophile Adipozytenangereicherte obere Phase, eine hydrophile Phase, sowie ein die Epithelzellen enthaltendes Zellpellet beobachtet werden (siehe Abb. 3.1 B).



**Abb. 3.1: Anatomie und Aufbereitung des murinen Brustfettgewebes. (A)** Anatomie des Brustfettgewebes einer ventral eröffneten weiblichen Maus. Mäuse besitzen auf beiden Seiten jeweils fünf Brustdrüsen, welche in Fettgewebe eingebettet sind. Zur Generierung von Organoiden wurde das abdominale Fettgewebe nach Entfernen des Lymphknotens verwendet. **(B)** Phasenbildung nach der Zentrifugation von enzymatisch verdaulichem Brustfettgewebe.

Das Zellpellet wurde in 20 ml Wachstumsmedium gewaschen und anschließend für nachfolgende Experimente verwendet. Zur Generierung von Organoiden wurde das Zellgemisch in 200-300 µl Matrigel aufgenommen, 50 µl des Ansatzes pro Vertiefung wurden in eine 24 Well-Platten überführt



und mit Wachstumsmedium versetzt. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte wie unter Abschnitt 3.3.3.2 beschrieben, wobei die Primärzellen und nachfolgenden Passagen jeweils mittels durchflusszytometrischer Analyse auf den prozentualen Anteil an Epithelzellen untersucht wurden.

### 3.3.3.2 Passagieren von Organoiden des Brustepithels

Dispase-Lösung (Stock): 100 mg/ml (100 U/ml) in HEPES-Puffer (1 M)

Die Kultivierung von Organoiden erfolgte in 24-Well-Platten oder Gewebekulturschalen (35 mM Ø). Zur Isolation der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zell-Matrigel-Tropfen wurden vorsichtig mit DPBS gewaschen. In Abhängigkeit von der nachfolgenden Untersuchung wurden die Zellen entweder als intakte Organoiden oder partiell bzw. vollständig vereinzelte Zellsuspensionen aus der Basalmembranmatrix extrahiert. Das Passagieren der Zellen erfolgte 1-2x pro Woche nach enzymatischer und mechanischer Dissoziation und einer partiellen Vereinzelung der Organoiden. Dafür wurde der Zell-Matrigel-Tropfen mit 0,3 ml Dispase-Lösung (1 U/ml) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde für 5-10 min bei 37 °C inkubiert, in ein 5 ml-Reaktionsgefäß überführt und nachfolgend für 3 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das vorverdaute Zell-Matrigel-Pellet wurde nachfolgend mit 1 ml TrypLE Express versetzt, wodurch eine vollständige Depolymerisation des Matrigels und eine weitere Vereinzelung der Organoiden gefördert wurde. Dabei wurde der enzymatische Verdau durch mechanische Dissoziation unterstützt, welche durch kräftiges Auf- und Abpipettieren mit einer P1000-Pipette erfolgte. Um den Durchmesser der Spitzenöffnung zu minimieren, wurde dafür eine 10 µl-Pipettenspitze über eine 1 ml-Pipettenspitze gesteckt. Das Gemisch wurde für 10-15 min bei 37 °C inkubiert und dabei alle 5 min durch erneute mechanische Dissoziation vereinzelte. Partielle und vollständig vereinzelte Organoiden wurden zweimal mit Wachstumsmedium gewaschen und anschließend in gewünschter Verdünnung passagiert. Dafür wurde das Zell-Pellet in Matrigel aufgenommen und in Well-Platten oder Gewebekulturschalen ausgesät. Zur Polymerisation des Matrigels wurden die Platten für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und nachfolgend mit Wachstumsmedium versetzt.

Für durchflusszytometrische Analysen und/oder Fluoreszenz-basierte Zellanreicherung wurden Organoiden wie oben beschrieben aus Matrigel isoliert und durch enzymatischen Verdau mit Hilfe von TrypLE Express und mechanische Dissoziation vereinzelte. Um verbleibende partiell verdaute Organoiden und Zell-Matrigel-Klumpen zu separieren, wurde die Zellsuspension zusätzlich durch ein Zellsieb (Porengröße: 100 µm) filtriert.

Erfolgte die Isolation intakter Organoiden, wurde das Matrigel vorsichtig in kaltem Medium aufgenommen, in einem 5 ml Reaktionsgefäß gesammelt und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert.

Es folgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 1300 rpm und ein weiterer Waschschriff mit kaltem Medium. Das verbleibende Zell-Matrigel-Pellet wurde anschließend mit 1 ml TrypLE Express versetzt und für 5 min bei 37 °C inkubiert, bevor es erneut mit kaltem Medium versetzt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert wurde. Das Organoid-haltige Pellet wurde nachfolgend für weitere Untersuchungen verwendet.

### 3.3.3.3 Kryokonservierung und Auftauen von Organoiden des Brustepithels

Y-27632: 10 mM in ddH<sub>2</sub>O

Die Kryokonservierung von Organoiden erfolgte mit Zellen, die 2-3 Tage zuvor passagiert wurden. Zum Ernten der Organoide wurden diese wie unter 3.3.3.2 beschrieben ohne vollständige Vereinzlung aus Matrigel isoliert. Das Organoid-Pellet wurde mit kaltem Einfriermedium versetzt, in Kryokonservierungsröhrchen aliquotiert und anschließend in einem Einfrierbehälter (Mr. Frosty/CoolCell LX) für mindestens 4 h bei -80 °C gelagert, bevor die Aliquots für die Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen der Organoide wurden Kryokonservierungsröhrchen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit vorgewärmtem Kulturmedium versetzt und anschließend 1-2x mit Wachstumsmedium gewaschen. Das Zellpellet wurde nachfolgend in 100 µl Matrigel aufgenommen und in 24-Well-Platten ausgesät. Nach Polymerisation des Matrigels wurde den Zell-Matrigel-Tropfen Wachstumsmedium beigefügt, welches zusätzlich mit Rho-Kinase (ROCK)-Inhibitor Y27632 (10 µM) versetzt wurde.

### 3.3.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zelldichte und Viabilität erfolgte durch mikroskopische Auszählung mit Hilfe einer Einweg-Zählkammer (Kova) oder mittels automatisierter Zellzählung unter Verwendung des Countess II. Zur Probenvorbereitung wurde ein Aliquot der Zellsuspension in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau (0,4%ige Lösung) versetzt, sodass tote Zellen mit fehlender Membranintegrität angefärbt und von der nachfolgenden Zählung ausgeschlossen werden konnten. Für die automatisierte Zellzählung wurden 10 µl und für die manuelle Bestimmung 15 µl des Gemisches in die entsprechenden Zählkammern überführt. Die Berechnung der Zellzahl nach mikroskopischer Auszählung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zelldichte (Zellen/ml)} = \frac{\text{Anzahl gezählter Zellen}}{\text{Anzahl der Raster}} \times 90 \text{ (Kammerfaktor)} \times 2 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^3$$

### 3.3.5 Genetische Modifikation von Säugetierzellen

Die genetische Modifikation eukaryotischer Zellen erfolgte mittels Transfektion oder durch lentivirale Transduktion. Für die stabile Transfektion von Zellen wurden eukaryotische Expressionsvektoren verwendet, welche die Transgen-Expression unter Kontrolle spezifischer Promotoren vermitteln. Das rekombinante Plasmid enthält dabei neben dem Gen von Interesse einen Resistenzmarker, der eine Selektion der transfizierten Zellen durch Zugabe des jeweiligen Antibiotikums ermöglicht. Der Gentransfer durch Transduktion erfolgte unter Verwendung lentiviraler Vektoren, die eine Integration von Transgenkassetten in das Wirtsgenom von Zielzellen vermitteln. Erfolgreich modifizierter Zellen wurden mittels Fluoreszenz-basierter Zellsortierung angereichert.

#### 3.3.5.1 Transfektion zur Erzeugung genetisch modifizierter Zelllinien

Für die stabile Transfektion wurde das jeweilige Expressionsplasmid mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert und mit Hilfe des Gelextraktions-Kits aufgereinigt. Einen Tag vor der Transfektion wurden  $2,5 \times 10^5$  Zielzellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium verworfen und die Zellen wurden 60-90 min vor der Transfektion mit 2 ml serumfreiem Medium versetzt. Für die Transfektion wurde ein Reaktionsgefäß A mit 250  $\mu$ l Opti-MEM und 5  $\mu$ g linearisierter Plasmid-DNA sowie ein Reaktionsgefäß B mit 250  $\mu$ l Opti-MEM und dem dreifachen DNA-Volumen des auf Raumtemperatur vorgewärmten Transfektionsreagenz FuGENE versetzt. Die DNA- und FuGENE-Lösungen wurden vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor der Ansatz unter gleichmäßiger Verteilung tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert wurde. Nach einer 6-stündigen Inkubation wurde der Transfektionsansatz durch 2 ml Wachstumsmedium ersetzt. Die Zellen wurden nachfolgend für 2-3 Tage expandiert und anschließend in Selektionsmedium kultiviert. Die dabei zu verwendende Antibiotikakonzentration wurde zuvor in einem *Killing-Curve*-Experiment (siehe 3.3.9) ermittelt.

#### 3.3.5.2 Lentivirale Transduktion

Die genetische Modifikation von eukaryotischen Zellen mittels Transduktion erfolgte mit Hilfe replikationsinkompetenter lentiviraler Vektoren. Für die Virusproduktion wurde ein Drei-Plasmid-System verwendet, welches nach Ko-Transfektion in HEK293T-Zellen die Expression der für die Vektorherstellung benötigten Gene vermittelt. Dabei enthält das Transferplasmid ein Verpackungssignal und die zu integrierenden Transgene, welche von HIV-1 abgeleiteten *Long terminal repeats* (LTR) flankiert sind. Die für die Partikelbildung notwendigen Proteine (Gag, Pol von HIV-1) sowie das Hüllprotein (Env) wurden über Helferplasmide (pCMV\_ΔR8.91 sowie pMD2.G oder M187) zur Verfügung gestellt. Für die Herstellung ecotroper Viruspartikel mit Nagetier-spezifischem Tropismus

wurde das Hüllprotein des Murinen Leukämievirus (MLV) verwendet, während amphotrope Vektoren mit dem Hüllprotein des Vesikulären Stomatitis-Virus (VSV) pseudotypisiert wurden.

### Herstellung lentiviraler Viruspartikel

Für die Herstellung lentiviraler Vektoren wurden  $4\text{-}5 \times 10^6$  HEK293T Zellen in einem Gesamtvolumen von 10 ml Wachstumsmedium über Nacht in einer 10 cm Gewebekulturschale kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Wachstumsmedium verworfen und die Zellen wurden 60-90 Minuten vor der Transfektion mit 5 ml serum- und antibiotikafreiem Medium versetzt. Für die Herstellung MLV-pseudotypisierter Vektorpartikel wurde das Transfektionsreagenz FuGENE verwendet, während VSV-G-pseudotypisierte Viruspartikel durch Transfektion mit Polyethylenimin (PEI) generiert wurden. Dafür wurden, wie in Tab. 3.4 beschrieben, ein DNA-enthaltendes Reaktionsgefäß sowie ein Transfektionsreagenz-enthaltendes Reaktionsgefäß vorbereitet, deren Inhalt vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Tab. 3.4 Pipettierschema für die Ko-Transfektion von HEK293T Zellen zur Herstellung von Vektorpartikeln

Pseudotypisierung	MLV	VSV-G
<b>Reaktionsgefäß A</b>		
Medium/Puffer	250 µl Opti-MEM	250 µl DPBS
Transferplasmid	10 µg	10 µg
Hüllplasmid	9 µg (M187)	3,5 µg (pMD2.G)
Verpackungsplasmid	6,5 µg (pCMV_ΔR8.91)	6,5 µg (pCMV_ΔR8.91)
<b>Reaktionsgefäß B</b>		
Medium/Puffer	250 µl Opti-MEM	250 µl DPBS
Transfektionsreagenz	3 µl FuGENE pro 1 µg DNA	2,7 µl PEI (10 mM) pro 1 µg DNA

Der Transfektionsansatz wurde anschließend tröpfchenweise auf die Zellen verteilt, für 6 h bei 37 °C inkubiert und anschließend durch 5 ml Wachstumsmedium ersetzt. Der Viruspartikel-enthaltende Kulturüberstand wurde 2-3 Tage nach der Transfektion gesammelt, filtriert (Porengröße: 0,45 µm) und für die Transduktion von Zielzellen verwendet oder bis zur weiteren Anwendung bei 4 °C gelagert.

### Transduktion

Für die Transduktion adhärenter Zellen wurden diese am Vortag in einer Dichte von  $2,5 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät. Suspensionszellen und Organoiden hingegen wurden am Tag der Transduktion geerntet und vereinzelt. Anschließend wurden  $2,5\text{-}5 \times 10^5$  Zellen mit 2 ml virushaltigem Kulturüberstand versetzt und in die Vertiefung einer 6-Well-Platte überführt. Die Transduktion erfolgte in Anwesenheit von 8 µg/ml Polybren und unter Durchführung einer *Spinfection*, bei der die Well-Platte für 90 min bei 1800 rpm und 32 °C zentrifugiert wurde. Nach einer 6-stündigen Inkubation bei 37 °C wurde der Überstand durch Kulturmedium ausgetauscht. Organoiden wurden zuvor gewaschen und wie unter 3.3.3 beschrieben mit Matrigel versetzt. Nach 3-5 Tagen erfolgte die Analyse der transduzierten Zellen mittels Durchflusszytometrie oder Mikroskopie.

### Bestimmung des Vektortiters von Viruspartikel-enthaltendem Kulturüberstand

Um die Anzahl infektiöser Vektorpartikel (engl., *Transducing Unit per ml*, TU/ml) zu ermitteln, wurden  $5 \times 10^4$  HEK293T oder 3T3-Zellen in eine 24-Well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde der Kulturüberstand verworfen und die Zellen wurden mit 0,5 ml Viruspartikel-enthaltendem Kulturüberstand versetzt. Zuvor wurde aus den Kulturüberständen eine Verdünnungsreihe von 3-4 seriellen 10-fach Verdünnungen hergestellt. Die Transduktion erfolgte wie oben beschrieben. Die Zellen wurde 2-3 Tage nach der Transduktion gesammelt, fixiert und anschließend wurde durchflusszytometrisch der Prozentsatz transduzierter Zellen bestimmt. Die Berechnung des Vektor-Titer wurde basierend auf Verdünnungen mit einer Transduktionseffizienz von  $\leq 25\%$  mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Transducing Units/ml} = \frac{\text{Anzahl ausgesäter Zellen} * \frac{\text{Transduzierte Zellen (\%)}}{100 (\%)}}{\text{Volumen des zugegebenen Überstandes (ml)}}$$

### 3.3.6 Killing Curve

Die Etablierung einer *Killing Curve* stellt ein Dosis-Wirkungs-Experiment dar, bei welchem durch Zugabe unterschiedlicher Antibiotika-Konzentrationen die optimale Dosis zur Selektion modifizierter Zellen mit entsprechender Resistenz ermittelt werden kann. Dafür wurden nicht modifizierte Zellen in einer geringen Dichte von  $1-2,5 \times 10^4$  pro Vertiefung einer 24-Well-Platte ausgesät und in Triplikaten mit unterschiedlichen Konzentrationen des entsprechenden Antibiotikums kultiviert. Anschließend wurden die Zellen alle 2-3 Tage mikroskopisch analysiert und mindestens alle drei Tage mit frischem Antibiotika-haltigen Medium versetzt. Die Selektion erfolgte in Abhängigkeit von dem verwendeten Antibiotikum für 10-14 Tagen und wurde anschließend in einer mikroskopischen Endpunktanalyse oder durch Anfertigung einer Kristallviolett-Färbung (siehe Abschnitt 3.6.1) ausgewertet. Für die Selektion modifizierter Zellen wurde nachfolgend die niedrigste Konzentration eingesetzt, bei welcher alle nicht modifizierten Zellen abgetötet wurden.

## 3.4 Durchflusszytometrische Analysen

FACS-Puffer:	3% (v/v) FBS, 2 mM EDTA (v/v) in 1x DPBS
Human BD Fc Block™	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
TruStain FcX™ (anti-mouse CD16/32):	Biolegend (San Diego, USA)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse und/oder Aufbereitung von Partikeln oder Zellen aufgrund unterschiedlicher morphologischer und physikalischer Parameter. Dabei können bestimmte

Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen durch geeignete Vorbehandlung wie beispielsweise einer Färbung mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern analysiert werden. Durch hydrodynamische Fokussierung werden die Zellen vereinzelt und nachfolgend in der Messzelle mit einem oder mehreren Lasern angeregt. Die dabei entstehende Lichtstreuung und emittierte Fluoreszenz kann mit Hilfe von unterschiedlichen Detektoren (engl: *Photomultiplier tubes*, PMTs) in elektronische Signale umgewandelt werden. Aufschlüsse über die Zellgröße können dabei aus dem im sogenannten *Forward Scatter* (FCS) detektierten Streulicht abgeleitet werden, während Informationen über die Granularität von Zellen durch abgelenktes Licht mit Hilfe des *Sideward Scatter* (SSC) generiert werden. Weitere PMTs detektieren einfallendes Licht, welches über ein optisches System aus vorgeschalteten Spiegeln und Bandpassfiltern in einzelne Wellenlängenbereiche aufgetrennt werden und somit eine Mehrfarbenfluoreszenzanalyse auf Einzelzellebene ermöglichen. Die spektrale Überlagerung (*Spillover*) verschiedener Fluorochrome oder Fluorophore kann dabei mittels elektronischer Subtraktion (Kompensation) eliminiert werden.

Für die durchflusszytometrische Analyse verschiedener Zelllinien, Organe oder Organoide wurden Einzelzellsuspensionen angefertigt. Suspensionszellen wurden dafür durch Resuspendieren vereinzelt, während adhärenente Zellen durch Trypsin von den Kulturoberflächen gelöst wurden. Für die Herstellung von Zellsuspensionen aus Organen, Tumoren oder von Organoiden wurde die Proben enzymatisch dissoziiert und zusätzlich durch einen Zellsieb vereinzelt. Anschließend erfolgten weitere Schritte wie beispielsweise eine Antikörperfärbung. Die Proben wurden, wenn nicht anders beschrieben, in FACS-Puffer aufbewahrt und mit biexponentieller Verstärkung gemessen. Als Kontrolle dienten ungefärbte oder nicht modifizierte Zellen und gegebenenfalls Zellen, die nur mit Sekundärantikörper gefärbt wurden. Die Analyse der Messungen erfolgte mit der Software FlowJo oder FACSDiva.

### **3.4.1 Bestimmung der Transfektions- und Transduktionseffizienz**

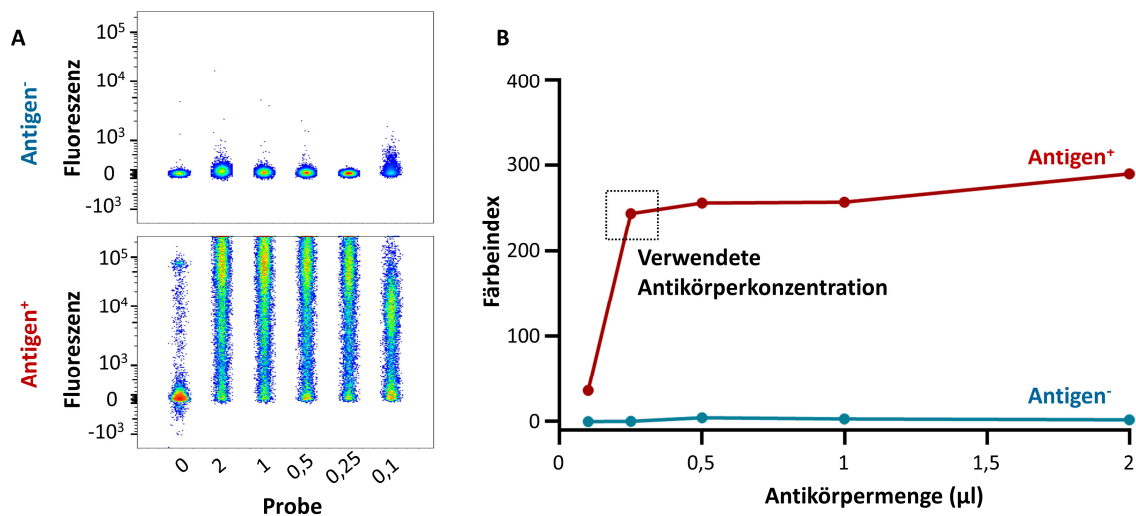
Nach der genetischen Modifikation von Zellen erfolgte die Bestimmung der Transfektions- oder Transduktionseffizienz mittels FACS-Analyse. Dabei wurden Zellen, die nach erfolgreichem Gentransfer ein Reportergen exprimieren, ohne zusätzliche Aufbereitung analysiert. Zellen, die zur Expression bestimmter Oberflächenproteine modifiziert wurden, konnten mit Hilfe einer Antikörperfärbung (siehe 3.4.3) detektiert werden. Zur Vorbereitung der Proben wurden  $2,5 \times 10^5$  Zellen in einem Rundbodenröhrchen gesammelt, mit FACS-Puffer gewaschen und falls nötig gefärbt. Die Zellen wurden für 10 min bei Raumtemperatur mit 4%igem PFA fixiert, anschließend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und dann durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurde der Anteil der Reportergen-exprimierenden bzw. durch Antikörper markierten Zellen ermittelt, wobei unmodifizierte Zellen als Kontrolle dienten.

### 3.4.2 Titration von Antikörpern

Um unspezifische Hintergrundsignale zu reduzieren und eine optimale Auftrennung in multiparametrischen FACS-Analysen zu gewährleisten, wurde zunächst in Titrationsexperimenten die optimale Konzentration der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper ermittelt. Dafür wurde eine Verdünnungsreihe des entsprechenden Antikörpers angefertigt, in welcher die vom Hersteller empfohlene Konzentrationen sowie drei bis vier serielle Verdünnungen gewählt wurden. Diese wurden nachfolgend für die Färbung (siehe 3.4.3 und 3.4.7) von Zellgemischen oder Zelllinien verwendet, welche zum einen das Antigen exprimieren sowie Zellen, die keine Expression aufweisen sollen (siehe Abb. 3.2 A). Die optimale Konzentration wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Färbeindex} = \frac{\text{MFI (positive Population)} - \text{MFI (negative Population)}}{2 \times \text{SD}}$$

Wie in Abbildung 3.2 graphisch dargestellt, wurde nachfolgend die Antikörperkonzentration gewählt, welche außerhalb des Sättigungsbereichs den höchsten Färbeindex aufwies und somit die bestmögliche Separation der positiven und negativen Fraktion zeigte.



**Abb. 3.2: Antikörpertitration.** (A) Dotplots einer repräsentativen Antikörpertitration gegen Antigen-negative (oben) und Antigen-positive Zellen (unten). Dabei zeigt die y-Achse die Fluoreszenzintensität der auf die x-Achse aufgetragenen individuellen Proben nach Färbung mit unterschiedlicher Antikörperkonzentration. (B) Graphische Darstellung zur Ermittlung der optimalen Antikörperkonzentration. Gezeigt ist der Färbeindex in Abhängigkeit von der verwendeten Antikörpermenge (µl).

### 3.4.3 Detektion von Oberflächenantigenen

Zum Nachweis von Oberflächenantigenen wurden die entsprechenden Zellen mit Fluorochromgekoppelten Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Dafür wurden die Zellen gezählt, die gewünschte Menge der Zellsuspension in einem Rundbodenröhrchen gesammelt und mit FACS-Puffer gewaschen. Handelte es sich bei den Proben um dissoziiertes Gewebe mit heterogenen

Zellpopulationen oder Zelllinien mit potenzieller Fc-Rezeptor-Expression, wurden diese für 5 min mit Fc-Block ( $1 \mu\text{l}/1 \times 10^6$  Zellen) inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit vortitrierten Antikörpern versetzt und für 20-30 min bei 4 °C im Dunkeln gefärbt. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen und Hintergrundsignale zu minimieren, wurden die Proben nachfolgend zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Bei Verwendung unkonjugierter Primärantikörper wurden die Proben nachfolgend mit Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt, welche nach einer 15-minütigen Inkubation durch dreimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt wurden.

Für die Analyse von *Multi-color-Panels* wurde, wenn nötig, eine Kompensation (siehe Abschnitt 3.4.4) durchgeführt. Zur Etablierung solcher Mehrfarbenfluoreszenzanalysen wurden außerdem sogenannte FMO (*Fluorescence minus one*) Kontrollen angefertigt, aus denen Aufschlüsse über potenzielles *Spillover* einzelner Fluorochrome gewonnen werden können und die zusätzlich die akkurate Datenauswertung durch ein optimiertes *Gating* ermöglichen.

### 3.4.4 Kompensation von Mehrfarbenfluoreszenzanalysen

*AbC Total Antibody Compensation kit:* Invitrogen (Waltham, USA)

*ArC Amine Reactive Compensation beads:* Invitrogen (Waltham, USA)

Mit Hilfe einer Kompensation können spektrale Überlagerungen unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe in den verschiedenen Detektionskanälen rechnerisch korrigiert werden. Dazu wurden Einzelfärbungen aller in einem Mehrfarbenexperiment verwendeten Fluorochrome und/oder Farbstoffe durchgeführt. Für die Färbung wurden entweder Zellen oder sogenannte *Compensation Beads* verwendet. Die Verwendung der *Compensation beads* erfolgte nach Herstellerangaben, wobei *AbC Compensation beads* mit  $1 \mu\text{l}$  Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern und *ArC Amine beads* mit  $1 \mu\text{l}$  vorverdünntem Farbstoff zur Lebend-Tot-Diskriminierung gefärbt wurden. Bei Verwendung von Zellen wurden die Kompensationskontrollen mittels klassischer Antikörperfärbung angefertigt, in welcher die durch Titrationsexperimente ermittelten, optimalen Antikörperkonzentrationen eingesetzt wurden. Für die Einzelfärbung mit einem Farbstoff zur Lebend-Tot-Diskriminierung wurden die Zellen zuvor durch eine 15-minütige Inkubation bei 65 °C abgetötet. Die automatisierte Kompensation erfolgte durch die am Durchflusszytometer verwendete Software DIVA, nachdem 5000 gefärbte Zellen/Beads und 5000 ungefärbte Zellen/*negative beads* aufgenommen waren. Etwaige Ungenauigkeiten wurden in der anschließenden Auswertung mittels FlowJo durch Erstellen einer alternativen Kompensationsmatrix optimiert.



### 3.4.5 FACS-basierte Lebend-Tot-Diskriminierung

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Lösung (Stock):	10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Fixable Viability Dye eFluor™ 780:	Invitrogen (Waltham, USA)
Propidium-Iodid (PI)-Lösung (Stock):	1 mg/ml in DPBS

Die Diskriminierung toter Zellen erfolgte durch eine Färbung mit einem der oben aufgeführten Farbstoffe. Dabei wurde der jeweilige Farbstoff in Abhängigkeit von den im *Multi-color*-Experiment verwendeten Antikörpern sowie der nachfolgenden Applikation gewählt. Zellen, die sortiert und nachfolgend weiter kultiviert werden sollten, wurden mit eFluor780 gefärbt. Dafür wurde 1 µl der 1:10 verdünnten Farbstofflösung während der letzten 5 Minuten einer Antikörperfärbung zugegeben und der Farbstoff dann durch dreimaliges Waschen entfernt. Die Färbung mit DAPI oder PI erfolgte analog der eFluor-Färbung ebenfalls am Ende einer Antikörperfärbung. Alternativ wurden die Zellen unmittelbar vor der Analyse mit DAPI- (0,1 µg/ml) oder PI-enthaltender Färbelösung (1 µg/ml) versetzt und ohne vorheriges Waschen gemessen.

### 3.4.6 Fluoreszenz-basierte Zellanreicherung

Neben immunphänotypischen Analysen ermöglicht *Fluorescence-Activated Cell-Sorting* (FACS) auch das Anreichern von Zellen aus heterogenen Mischpopulationen, die sich aufgrund optischer Merkmale unterscheiden. Zur Vorbereitung der Proben wurden die Zellen gezählt, durch einen Zellsieb (40-100 µm) vereinzelt und nachfolgend in sterilen Rundbodenröhrchen mit Deckel überführt. Zellen, die nicht über die Expression von Reportergenen angereichert werden konnten, wurden mittels Antikörperfärbung markiert. Zur Diskriminierung toter Zellen erfolgte zudem eine Färbung mit eFluor780 (siehe 3.4.5). Neben dem Anreichern definierter Zellpools wurden auch monoklonale Zelllinien generiert. Dafür wurden Einzelzellen bereits vorselektionierter Zelllinien in einzelne Vertiefungen einer 96-Well-Platten sortiert. Die Effizienz wurde mikroskopisch kontrolliert, sodass für die nachfolgende Expansion lediglich die Vertiefungen verwendet wurden, in denen sich unmittelbar nach der Einzelzellsortierung eine einzige Zelle befand.

### 3.4.7 Intrazelluläre Färbung

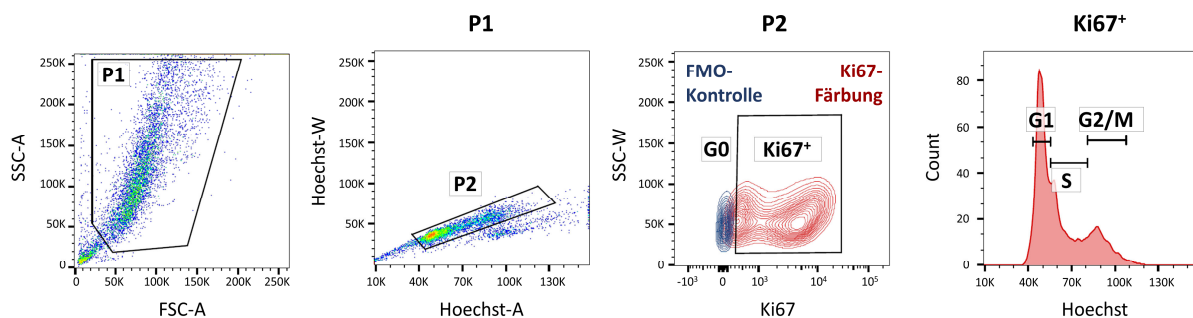
eBioscience™ <i>FoxP3/Transcription factor staining buffer</i> Set:	Invitrogen (Waltham, USA)
	3 % (w/v) BSA oder 3 % (v/v) FBS in
Waschpuffer:	DPBS

Die durchflusszytometrische Detektion intrazellulärer Antigene mittels Antikörperfärbung erfolgte nach Fixierung der Zellen. Bei Analysen, die zudem eine Oberflächenantigen-Detektion oder Lebend-Tot-

Diskriminierung vorsahen, wurden die Zellen zuvor entsprechend gefärbt und erst im Anschluss an die jeweiligen Applikationen fixiert. In Abhängigkeit vom Antigen, dessen Lokalisation sowie Herstellerempfehlungen wurden dafür verschiedene Fixier-Ansätze gewählt. Für intrazelluläre Färbungen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen entweder mit eiskaltem 70%igem Ethanol und einstündiger Inkubation bei  $-20^\circ\text{C}$  (Ki67) oder dem *FoxP3/Transcription factor staining buffer Set* (p53, Phospho-p-Erk1/2) nach Angaben des Herstellers fixiert und permeabilisiert. Die Zellen wurden nach dem Fixieren zweimal mit FBS- oder BSA-haltigem DPBS gewaschen und für 4-12 h mit dem Primärantikörper bei  $4^\circ\text{C}$  im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal gewaschen, wenn nötig für 1 h mit Sekundärantikörper gefärbt und erneut gewaschen. Als Kontrolle dienten fixierte Zellen, die nicht oder nur mit Sekundärantikörper gefärbt wurden.

### 3.4.8 Zellzyklusanalyse

Die durchflusszytometrische Zellzyklusanalyse erfolgte mittels Ki67- und Nukleinsäure-Färbung. Für die Zellzyklusanalyse wurden pro Ansatz  $2,5 \times 10^5$  Zellen in die Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgesät und für ein bis zwei Tage kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, fixiert und mit einem Ki67-spezifischen Antikörper gefärbt. Etwa 5 Minuten vor der Analyse wurden die Zellen mit  $150 \mu\text{l}$  Hoechst 33342-Lösung (1:2000 in DPBS) versetzt. Im Gegensatz zu konventionellen FACS-Messungen erfolgte die Darstellung des Hoechst-Signals mit linearer Verstärkung. Nach Diskriminierung der Dubletten (Hoechst-W vs. Hoechst-A; P2) und Identifikation der proliferierenden Zellen (Ki67-positiv) erfolgte eine weitere Unterteilung der Zellzyklus-Phase über die Quantifizierung des DNA-Gehalts (siehe Abb. 3.3).



**Abb. 3.3: Repräsentative Gating-Strategie der Zellzyklusanalyse.** P1 umfasst alle Zellen und diskriminiert Zelltrümmer sowie kleinere Partikel, während über P2 Dubletten ausgeschlossen werden. Im Folgeplot werden die Zellen auf die Expression von Ki67 untersucht. Dabei wurde das Gate der Ki67<sup>+</sup> Zellen anhand der *Fluorescence minus one* (FMO)-Kontrolle (blau) festgelegt. Ki67 negative Zellen können der G0-Phase zugeordnet werden. Im nachfolgenden Histogramm erfolgte über die Intensität des Hoechst-Signals eine weitere Einteilung der Zellzyklusphasen.

### 3.4.9 Nachweis von $\beta$ -Galaktosidase mittels Fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranosid (FDG)

FDG-Lösung (Stock): 20 mM FDG in einer DMSO-EtOH-ddH<sub>2</sub>O-Lösung (1:1:8)

FDG stellt ein membranpermeables Substrat für  $\beta$ -Galaktosidase dar, welches im Gegensatz zur klassischen X-Gal-Färbung auch in lebenden Zellen verwendet werden kann. Dabei wird FDG von  $\beta$ -Galaktosidase zu einem fluoreszierenden Farbstoff, dem sogenannten Fluorescein, hydrolysiert und kann somit durchflusszytometrisch (*Excitation/Emission*: 490/525) detektiert werden. Zur Vorbereitung des Experiments wurden Organoide zu einer Einzelzellsuspension aufbereitet, eine 2 mM FDG-Lösung in serumfreiem Medium hergestellt und HBSS-Puffer auf Eis gekühlt. Dissoziierte Organoide wurden mit serumfreiem Medium gewaschen, auf eine Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und in Triplikaten aus jeweils 100  $\mu$ l der Zellsuspension in Rundbodenröhrchen überführt. Nachfolgend wurden die Proben sowie die FDG-Lösung für etwa 10 Minuten im Wasserbad vorgewärmt. Die Zellen wurden anschließend mit 100  $\mu$ l FDG versetzt. Dabei wurden gleiche Inkubationszeiten gewährleistet, indem FDG zu aufeinanderfolgenden Proben mit einer jeweils 20-sekündigen Verzögerung pipettiert wurde. Zum Abstoppen der Enzymreaktion erfolgte nach 20 Minuten die Zugabe von 1,8 ml eiskaltem HBSS in gleicher zeitlich versetzter Reihenfolge. Die Zellen wurden für weitere 20-30 min auf Eis gelagert, abzentrifugiert, mit kaltem serumfreiem Medium versetzt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

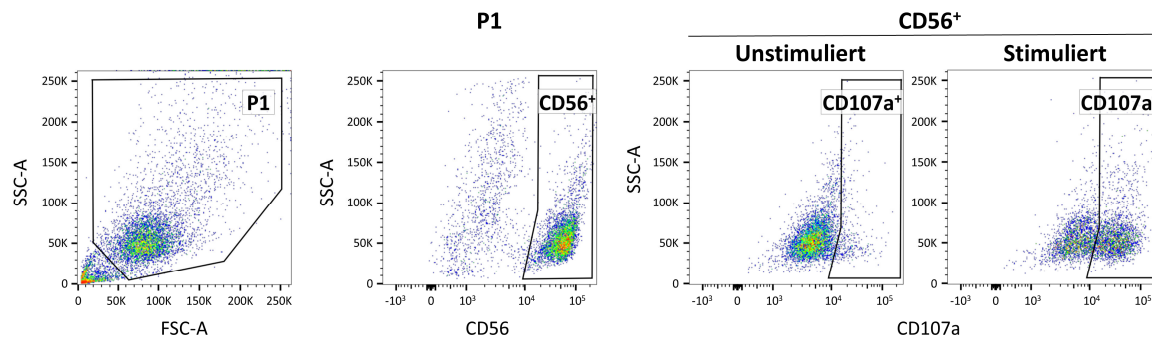
### 3.4.10 Durchflusszytometer-basiertes Degranulationsassay

Golgi-Stop <sup>TM</sup> (Monensin):	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Ionomycin-Stammlösung:	1 mg/ml in DMSO
PMA (Phorbol-12-Myristat-13-Acetat)-Stammlösung:	1 mg/ml in DMSO

Die Degranulation von NK-Zellen wurde über die Oberflächenexposition des Rezeptors CD107a (LAMP-1) analysiert. CD107a ist ein Protein, welches sich in der Membran zytotoxischer Granula befindet und nach erfolgter Degranulation an die Oberfläche der Plasmamembran mobilisiert. Die während einer Ko-Kultur von Effektor- und Zielzellen auf der Oberfläche exponierten CD107a-Moleküle können mittels Antikörperfärbung detektiert werden und Aufschlüsse über die Aktivierung, Degranulation und damit einhergehende Lyse von Zielzellen liefern.

Die Degranulation von NK-Zellen wurde über einen Stimulationszeitraum von 4 oder 24 h untersucht. Dafür wurden die Effektor- und Zielzellen auf eine Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Als Positivkontrolle wurden 500  $\mu$ l der NK-Zell-Suspension auf 1 ml aufgefüllt und mit PMA (5 ng/ml) und Ionomycin (50 ng/ml) versetzt. Unstimulierte Effektorzellen in 1 ml X-Vivo<sup>++</sup> dienten als Kontrolle der

spontanen Degranulation. Für die Ko-Kultur wurden jeweils 500 µl der Zellsuspensionen in einem 1:1 Verhältnis gemischt und in die Vertiefungen einer 24 Well-Platte ausgesät. Die Proben wurden anschließend mit CD107a-spezifischem Antikörper versetzt und im Brutschrank inkubiert. Nach einer einstündigen Initiationsphase wurde den Proben 0,5 µl Golgi-Stop zugesetzt. Die Zellen wurden nach 4 bzw. 24 h in einem Rundbodenröhrchen gesammelt, mit FACS-Puffer gewaschen und mit CD56-spezifischem Antikörper gefärbt. Die Analyse der CD107a-positiven NK-Zellen erfolgte nach der in Abbildung 3.4 dargestellten Gating-Strategie.



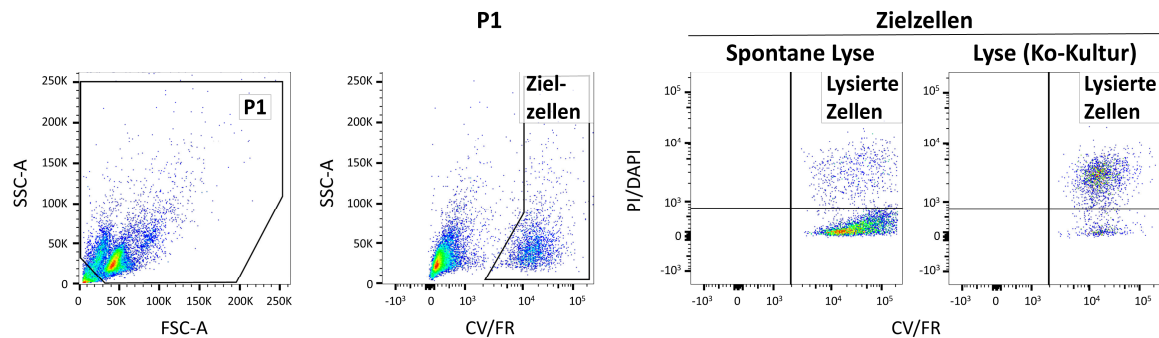
**Abb. 3.4: Repräsentative Gating-Strategie eines Durchflusszytometer-basierten Degranulationsassays.** P1 umfasst alle Zellen und diskriminiert Zelltrümmer und kleinere Partikel. Im Folgeplot werden aus der P1-Population CD56-positive Zellen gezeigt, welche im nachfolgenden Plot auf die Expression von CD107a untersucht wurden. Dabei wurde das CD107a Gate anhand der unstimulierten NK-Zellen festgelegt.

### 3.4.11 Durchflusszytometer-basiertes Zytotoxizitätsassay

<i>Calcein Violet AM</i> (CV):	0,6 mg/ml in DMSO
<i>CellTrace™ Far Red</i> (FR):	5 mM in DMSO
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)-Lösung (Stock):	10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Propidiumiodid (PI)-Lösung (Stock):	1 mg/ml in 1x DPBS

Die lytische Aktivität von NK-Zellen gegenüber Zelllinien und dissoziierten Organoiden wurde in durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassays analysiert. Hierfür wurden die Zielzellen geerntet, enzymatisch vereinzelt und mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurden  $1-2 \times 10^6$  Zielzellen mit *Calcein Violet* oder bei Expression eines GFP-abgeleiteten Reportergens mit *CellTrace™ Far Red* gefärbt. Dabei erfolgte die Färbung nach Herstellerangaben durch Inkubation der Zellen mit Farbstoff für 20-30 Minuten bei 4 °C (CV) oder im Brutschrank (FR). Überschüssiger Farbstoff wurde anschließend durch zweimaliges Waschen mit serumfreiem Medium entfernt. Die Zellen wurden in X-Vivo<sup>++</sup> resuspendiert und dabei auf eine Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Jeweils 100 µl der Suspension wurden in die Vertiefungen einer 96-Well Platte mit Rundboden überführt. Parallel zu den Zielzellen wurden die NK-Zellen geerntet, gezählt und anschließend zu den bereits vorgelegten Zielzellen in unterschiedlichen Effektor- zu Zielzell (E/T)-Verhältnissen pipettiert, wobei ein Ansatz ohne NK-Zell-

Zugabe zur Ermittlung der spontanen Lyse von Zielzellen mitgeführt wurde. Im Anschluss an eine 2- bis 4-stündige Ko-Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand wurde verworfen. Zur Detektion lysierter Zielzellen wurde das Zellpellet unmittelbar vor der durchflusszytometrischen Messung in 80 µl PI- (1 µg/ml) oder DAPI-Lösung (0,1 µg/ml) resuspendiert. Die Analyse der Messung erfolgte nach dem in Abbildung 3.5 gezeigten Gating. Dabei wurde der prozentuale Anteil toter Zielzellen bestimmt und nach Normalisierung gegen spontan lysierte Zellen, der Prozentsatz der NK-Zell spezifischen Lyse ermittelt.



**Abb. 3.5: Repräsentative Gating-Strategie eines Durchflusszytometer-basierten Zytotoxizitätsassays.** P1 umfasst alle Zellen und diskriminiert Zelltrümmer und kleinere Partikel. Zielzellen können im Folgeplot anhand der *Calcein Violet* (CV) oder *CellTrace™ Far Red* (FR)-Färbung identifiziert werden. PI- oder DAPI-positive Events ermöglichen eine Abgrenzung der apoptotischen und toten Zielzellen.

### 3.5 Konfokale Fluoreszenzmikroskopie

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie ermöglicht die konfokale Mikroskopie das Abbilden optischer Schnitte und das Zusammensetzen von in z-Achse ausgedehnter Schnittebenen zu dreidimensionalen Aufnahmen. Grundlage der konfokalen Mikroskopie sind Laser, welche durch beugungsbegrenzte Fokussierung einen Lichtfleck mit monochromatischer Wellenlänge auf das Objekt projizieren. Vom Objekt emittierte Fluoreszenz wird durch einen dichroitischen Strahlteiler von Anregungslicht getrennt, auf eine Blende fokussiert und nachfolgend von PMTs zu elektronischen Signalen umgewandelt und digitalisiert. Die in dieser Arbeit durchgeführten fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen erfolgten mit Hilfe des konfokalen *Spinning-Disk*-Mikroskops CQ1 (Yogogawa). Während ein Großteil der klassischen Konfokal-Mikroskope mit nur einem Detektionspunkt ein schrittweises Abrastern der Probe in x- und y-Richtung vornimmt, wird bei der *Spinning-Disk*-Mikroskopie durch eine rotierende Lochblendenscheibe (Nipkow-Scheibe) ein Multistrahl-Scanning ermöglicht, welches eine Vielzahl von Raumpunkten simultan darstellen kann. Dies ermöglicht Hochgeschwindigkeitsaufnahmen mit minimaler Belichtungszeit und somit eine Reduktion von Phototoxizität und Ausbleichen der Fluoreszenzreagenzien (*Photobleaching*).

### 3.5.1 Detektion fluoreszierender Proben

Mikroskopische Aufnahmen wurden mit Hilfe des CQ-1 angefertigt, dessen Laser bei Wellenlängen von 405, 488, 561 und 640 nm anregen können. Dabei wurden Proben in Well-Platten oder auf Objektträgern mit einer 4x-, 10x- oder 20x-Vergrößerung aufgenommen, wobei 20x-Vergrößerungen in der Regel mit einem *Long Working Distance* Objektiv angefertigt wurden. Waren höhere Vergrößerungen (40x, 60x) erforderlich, wurden die Proben in optischen Petrischalen oder in Kammerobjektträgern mit dünnem Borosilikatglas ausgesät oder nach dem Eindecken von konventionellen Objektträgern invers über das Deckglas mikroskopiert. Für die Aufnahmen wurde in der Regel eine *Excitation Power* von 80 % und eine Belichtungszeit von 100-400 ms gewählt. Anzahl und Abstände der Schnittebenen (z-Achse) wurden individuell für die jeweilige Applikation und in Abhängigkeit von den verwendeten Proben angepasst.

#### 3.5.1.1 Anziehen zweidimensionaler Zellkulturen für mikroskopische Analysen

Fibronektin-Lösung (1 mg/ml)	Merck/Sigma Aldrich (Taufkirchen)
Liquid-Blocker (PAP-Pen)	Electron Microscopy Sciences (Hatfield, USA)
Mowiol 4-88	Carl Roth (Karlsruhe)
VECTASHIELD <i>Antifade Mounting</i> Medium	VectorLaboratories (Burlingame, USA)
Poly-L-Lysin-Lösung (0,01%)	Merck/Sigma Aldrich (Taufkirchen)

Die Analyse zweidimensionaler Zellkulturen nach der Transduktion oder bei Detektion eines einzelnen Oberflächenantigens mit Fluorochrom-gekoppeltem Antikörper erfolgte bis zu einer 20x-Vergrößerung in Well-Platten. Für mikroskopische Immunfluoreszenz (IF)-Untersuchungen mit aufwendigerem Färbeprotokoll oder höheren Vergrößerungen wurden die Zellen hingegen auf vorbehandelten sterilen Objektträgern oder in Kammerobjektträgern und optischen Petrischalen ausgesät. Dafür wurden Objektträger mit Poly-L-Lysin und Petrischalen mit Fibronektin beschichtet. Zum Beschichten von optischen Petrischalen wurde die Oberfläche mit Fibronektin-Lösung (20 µg/ml) bedeckt. Anschließend wurden die Petrischalen für 10-20 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen, die Petrischalen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und mit der Zellsuspension versetzt. Das Beschichten von Objektträgern mit Poly-L-Lysin erfolgte nach Herstellerangaben, wobei bei Verwendung von Standard-Objektträgern die zu beschichtende Fläche zuvor mit einem wasserabweisenden PAP-Pen umrandet wurde.

Nach dem Anwachsen der Zellen und Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Proben in weiteren Applikationen (3.5.1.3-3.5.1.5) aufbereitet. Zur Konservierung der Färbung wurden fixierte Zellen bei Verwendung von Objektträgern und Kammerobjektträgern angetrocknet, mit *Antifade*

*Mounting* Medium oder Mowiol versetzt, anschließend mit Deckgläsern eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Mikroskopische Präparate in Well-Platten und optischen Petrischalen eigneten sich hingegen nur für kurzzeitige Lagerung oder zum Mikroskopieren von lebenden Zellen.

### 3.5.1.2 Immunfluoreszenzfärbung von Organoiden

Fixierlösung:	2 % (v/v) PFA, 0,25-1 % (v/v) Glutaraldehyd in DPBS
Proteinase K (20x):	400 µg/ml Proteinase K in einem TE-Puffer/Glycerol-Gemisch (1:1)
TE-Puffer:	50 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,5% Triton X-100 in ddH <sub>2</sub> O (pH 8,0)

Zur Konservierung dreidimensionaler Strukturen erfolgten mikroskopische Immunfluoreszenz-Analysen von Organoiden weitestgehend in Basalmembranmatrices. Dafür wurden Organoide vereinzelt, mit frischem Matrigel versetzt und jeweils 5 µl der Zell-Matrigel-Suspension in die Vertiefung einer 96-Well-Platte oder 4-5 Tropfen auf das Deckglas einer optischen Petrischale ausgesät und kultiviert. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz und Größe wurden die Organoide mit DPBS gewaschen und anschließend fixiert. Um dabei eine Depolymerisation des Matrigels zu verhindern, wurde das Fixativ mit Glutaraldehyd versetzt. In Abhängigkeit von der nachfolgenden Applikation wurde dabei der Glutaraldehyd-Zusatz angepasst, sodass Präparate für Einfachfärbungen von Oberflächenproteinen mit höheren Konzentrationen und intrazelluläre Färbungen mit anschließender Antigen-Demaskierung mit niedrigeren Konzentrationen fixiert wurden. Nach einer 60-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mindestens 4x für 10 min mit DPBS gewaschen und die Zellen nachfolgend permeabilisiert (siehe 3.4.1.4). Die Proben wurden anschließend gefärbt oder zunächst einer Antigen-Demaskierung unterzogen. Für die Antigen-Demaskierung wurde der enzymatische Verdau mit Proteinase K oder Trypsin bei unterschiedlichen Inkubationszeiten verglichen. Dabei erwies sich eine 10-minütige Inkubation bei 37 °C mit 0,05%iger Trypsin-Lösung als die effizienteste Methode, um Proben in Matrigel zu konservieren und gleichzeitig ausreichende Färb-Ergebnisse zu erzielen.

### 3.5.1.3 Detektion von Oberflächenantigenen

Hoechst 33342 (10 mg/ml):	Thermo Scientific (Waltham, USA)
Roti®Histofix 4%:	Carl Roth (Karlsruhe)
Fixierlösung:	2-4 % (v/v) PFA in DPBS +/- 0,25-1 % (v/v) Glutaraldehyd
Blockierlösung:	DPBS zuzüglich 1-3 % BSA

Bei der mikroskopischen Analyse wurden Oberflächenantigene mittels Antikörperfärbung nachgewiesen. Dafür wurden die Proben zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend für 10-15 min im Fall von Zellen bzw. 30-60 min bei Organoiden (siehe 3.5.1.2) in Fixierlösung bei Raumtemperatur

inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit DPBS und eine 60-minütige Inkubation in Blockierlösung. Für die Färbung wurden die Antikörper in Blockierlösung verdünnt, zu den Proben pipettiert und für mindestens 4 h oder bevorzugt über Nacht bei 4°C unter Lichtausschluss inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 3x mit DPBS gewaschen, wenn nötig mit Sekundärantikörper gefärbt und einer Gegenfärbung mit Hoechst 33342 oder Propidiumiodid unterzogen. Dabei erfolgte die Kernfärbung mit Hoechst 33342 durch eine 5-10-minütige Inkubation am Ende einer Antikörperfärbung, während die Färbung mit Propidiumiodid zunächst die Permeabilisierung der Zellmembran (siehe 3.5.1.4) erforderte.

#### 3.5.1.4 Detektion von intrazellulären Antigenen und Kernfärbung

Permeabilisierungspuffer

PBS + Tween:	0,1 % (v/v) Tween 20 in DPBS
PBS + Triton X-100:	0,1 % (v/v) Triton in DPBS
PBS + Saponin:	0,5 % (w/v) Saponin in DPBS
Blockierlösung:	1-3 % (w/v) BSA in Permeabilisierungsbuffer

Für den Nachweis intrazellulärer Strukturen und Antigene müssen die Zellen im Anschluss an die Fixierung und ggf. Oberflächenfärbung permeabilisiert werden. In Abhängigkeit von den verwendeten Antikörpern und Herstellerempfehlungen sowie subzellulärer Lokalisation des zu detektierenden Antigens wurden die Zellen für 10-30 min mit Tween-, Triton- oder Saponin-haltigem Puffer permeabilisiert, wenn erforderlich einer Antigen-Demaskierung (siehe 3.5.1.2) unterzogen und anschließend für 30-60 min in Blockierlösung inkubiert. Bei intrazellulären Färbungen von Organoiden in Matrigel wurden die Inkubationszeiten verdoppelt. Anschließend wurden die Antikörper in Blockierlösung verdünnt, zu den Proben gegeben und diese über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit DPBS oder bei Durchführung einer Saponin-basierten Permeabilisierung mit Saponin-haltigem Puffer gewaschen. Im Anschluss folgte die Kernfärbung und/oder Färbung mit sekundärem Antikörper. Die Präparate wurden anschließend mikroskopisch analysiert.

#### 3.5.1.5 Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen

Blockierlösung:	5 % (v/v) FBS in DPBS
Fixierlösung:	1 % (v/v) PFA in DPBS
Permeabilisierungspuffer:	0,5 % (v/v) Triton X-100 in DPBS

Die Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgte über den Nachweis von  $\gamma$ -H2AX, einem Phosphorylierungsmuster des H2AX-Histons, welches nach einer IF-Färbung als Focus um den Doppelstrangbruch sichtbar wird. Dafür wurden die Zellen in 8-Kammerobjektträgern ausgesät und für 1-2 Tage kultiviert. Zur Visualisierung der Zellgrenzen folgte eine Antikörperfärbung gegen ein



Oberflächen-assoziiertes Antigen (z.B. EpCAM). Die Zellen wurden anschließend mit DPBS gewaschen und für 10 min mit einer 1%igen PFA-Lösung fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS wurden die Zellen in Permeabilisierungslösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden erneut gewaschen und für 1 h mit Blockierlösung versetzt. Es folgte die Zugabe eines Fluorochrom-konjugierten Antikörpers mit Spezifität für  $\gamma$ -H2AX und Inkubation über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Morgen wurde eine Kernfärbung mit Propidiumiodid durchgeführt. Die Objektträger wurden anschließend mit *Mounting-Medium* überschichtet, mit Deckgläsern eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Zur Dokumentation wurden die Objektträger invers bei einer 60x-Vergrößerung mikroskopiert. Die Analyse der  $\gamma$ -H2AX-Färbung erfolgte mit Hilfe der CQ-1-Software. Dabei wurden die Zellgrenzen (*Cellbody*), Zellkerne (*Nuclei*) und Foci (*Granule*) definiert, um somit eine Maske zur Quantifizierung der Foci pro Zelle zu erstellen (siehe Anhang 1).

### 3.5.2 *Time-Lapse-Imaging* (Zeitraffer-Bildgebung)

Mikroskopische Langzeituntersuchungen erfolgten mit Hilfe von *Time-Lapse-Imaging*, bei dem Bildausschnitte durch serielle Aufnahmen über einen definierten Zeitraum beobachtet werden können. Neben räumlichen Informationen ermöglicht die Zeitraffer-Bildgebung auch, dynamische Prozesse an lebenden Zellen zu untersuchen. *Time-Lapse*-Analysen erfolgten mit Hilfe des *Spinning-Disk*-Mikroskops CQ1. Dabei wurde über einen Gasmischer die gewünschte Gas-Zusammensetzung von 5 % CO<sub>2</sub> definiert, über ein integriertes Wasserbad die Luft befeuchtet und eine Kammer-Innentemperatur von 37 °C gewählt. Die Abstände der Zeitrafferaufnahmen, z-Ebenen und Vergrößerung wurden individuell an die jeweilige Applikation angepasst.

#### 3.5.2.1 Mikroskopisches Degranulationassay

<i>BioTracker NucView<sup>®</sup>405 Blue Caspase-3 Dye:</i>	Merck Millipore (Darmstadt)
<i>LysoTracker<sup>TM</sup> Deep Red:</i>	Thermo Scientific (Waltham, USA)

Die Degranulation von NK-Zellen in mikroskopischen Experimenten wurde mit Hilfe von *LysoTracker* visualisiert. *LysoTracker* ist ein fluoreszierender Farbstoff, welcher saure Organellen markiert und somit zytotoxische Granula in Effektorzellen wie NK- oder T-Zellen anfärben kann. Zur Vorbereitung des Experiments wurden die Target-Zellen in Fibronectin-beschichtete 8-Kammerobjektträger mit Glasboden (Ibidi) ausgesät (siehe 3.5.1.1) und für 1-2 h kultiviert. Parallel wurden NK-Zellen mit vortitriertem *LysoTracker<sup>TM</sup> Deep Red* gefärbt. Dafür wurden die Effektorzellen geerntet, mit Wachstumsmedium gewaschen und für 30 min in 1 ml *LysoTracker*-enthaltendem X-Vivo<sup>++</sup> (1  $\mu$ M) im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden dann 4-5x in 15 ml Wachstumsmedium gewaschen und bis zur weiteren Verwendung im Dunkeln gelagert. Die Ko-Kultur wurde unmittelbar vor Beginn der Zeitraffer-

Bildgebung gestartet. Die Aufnahmen erfolgten bei einer 60x-Vergrößerung in einem Abstand von 5 Minuten. Da die erhöhte Aufnahmefrequenz ein Ausbleichen der *LysoTracker*-Färbung förderte, wurde das *Time-Lapse Imaging* für maximal 5 h durchgeführt.

### 3.5.2.2 Zytotoxizitätsassay mit Caspase-Sonde

<i>BioTracker NucView</i> <sup>®</sup> 405 Blue Caspase-3 Dye:	Merck Millipore (Darmstadt)
<i>CellTrace</i> <sup>™</sup> Far Red (1mM in DMSO):	Thermo Scientific (Waltham, USA)

Mikroskopische Zeitraffer-Bildgebung ermöglichte die Durchführung von *Real-time* Zytotoxizitätsstudien. Zudem wurden die Viabilität von Zellen unter Erhalt der dreidimensionalen Architektur von Organoiden untersucht. Zur Vorbereitung des Experiments wurden Reporter-gen-exprimierende Organoide aus Matrigel isoliert (siehe 3.3.3.2) und auf Fibronectin-beschichteten optischen Petrischalen oder in die Vertiefungen von Fibronectin-beschichteten Well-Platten ausgesät und für 1 h in Wachstumsmedium bei 37 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wurden NK-Zellen geerntet, mit DPBS gewaschen und mit *CellTrace*<sup>™</sup> Far Red (1 µM) versetzt. Die Zellen wurden für 20 min im Brutschrank gefärbt und anschließend zweimal mit X-Vivo<sup>++</sup> gewaschen. Für die Ko-Kultivierung wurden die Organoide mit *NucView*<sup>®</sup> 405 Caspase-3-Substrat versetzt, welches einen Echtzeitnachweis von Caspase-3- und Caspase-7-Aktivität ermöglicht. Nach Festlegung der experimentellen Parameter (z- Ebenen, Aufnahmefrequenz, *Excitation Power* und Belichtungszeit) wurden die NK-Zellen zu den *Target*-Zellen gegeben und die Aufnahme wurde gestartet.

## 3.6 Mikrotiterplatten-Assays

Mikrotiterplatten-Assays wurden mit Hilfe des SpectraMax iD3 gemessen. In Abhängigkeit von der durchgeführten Applikation wurde dabei die Absorption eines Farbstoffs oder die entstehende Chemilumineszenz einer enzymatischen Substratumsetzung bestimmt. Dabei wurden die Belichtungszeiten an das jeweilige Assay angepasst und auf 100-400 ms festgelegt.

### 3.6.1 Kristallviolett-Färbung

Roti <sup>®</sup> Histofix (PFA 4%)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kristallviolett (KV)-Lösung 0,5%	0,5 % (w/v) Kristallviolett in 20 % Methanol
Sorenson's Puffer	0,1 M Natrium-Citrat in 50 % Ethanol pH 4,2

Das Kristallviolett-Assay ist eine spektralphotometrische Endpunktanalyse, welche auf der unspezifischen Färbung von Zellen mit dem Farbstoff Kristallviolett. Mit Hilfe des Kristallviolett-Assays wurde der Einfluss verschiedener Testsubstanzen (z.B. G418 und Nutlin-3a) auf die Viabilität von Zellen

untersucht. Dazu wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen in die Vertiefungen von 24-Well-Platten ausgesät, am nächsten Tag im Triplikate mit verschiedenen Behandlungsansätzen versetzt und anschließend für mehrere Tage kultiviert. Nach Abschluss der Behandlung wurde das Medium verworfen und tote Zellen, die aus dem Adhäsionsverbund ausgetreten waren, wurden durch dreimaliges Waschen mit DPBS entfernt. Die verbliebenen Zellen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert, mit DPBS gewaschen und anschließend mit 200  $\mu$ l Kristallviolett-Lösung versetzt. Nach 20-minütiger Inkubation wurde der Überstand verworfen und nicht gebundener Farbstoff durch mehrmaliges Waschen mit ddH<sub>2</sub>O entfernt. Nach dem Trocknen der Platte wurde das in den Zellen verbliebene Kristallviolett durch Zugabe von 200  $\mu$ l Sorenson's Puffer in Lösung gebracht. Um bei der Messung eine Sättigung der Absorption zu vermeiden, wurden neben unverdünnten Proben auch 1:10 und 1:100 Verdünnungen angefertigt. Anschließend wurde die Absorption der Überstände bei einer Wellenlänge von 540 nm am SpectraMax iD3 bestimmt. Für die nachfolgende Analyse wurde die Absorption der unbehandelten Kontrolle auf 100 % Viabilität normiert und mit den verschiedenen Behandlungsansätzen verglichen.

### 3.6.2 Luciferase-Reporterassay

Fibronektin-Lösung (20 $\mu$ g/ml)	Merck/Sigma Aldrich (Taufkirchen)
VivoGlo™ Luciferin-Stammlösung	15 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Luciferin-Arbeitslösung	150 $\mu$ g/ml in Medium oder PBS

Luciferase-Reporterassays basieren auf der katalytischen Aktivität von Luciferase-Enzymen, welche nach genetischer Modifikation von Zellen exprimiert werden und nach Zugabe eines Substrats eine biolumineszierende Reaktion fördern. In dieser Arbeit wurde *Firefly*-Luciferase (luc) verwendet, welche unter Sauerstoffverbrauch und in Gegenwart von ATP und Magnesium-Ionen die Oxidation des Substrats Luciferin katalysiert. Bei dieser Reaktion freiwerdende Energie wird in Form von Photonen abgegeben und kann in einer luminometrischen Messung mit hoher Sensitivität quantifiziert werden. Aufgrund geringer Stabilität von freier luc in Lösung ist die katalytische Aktivität des Enzyms hauptsächlich auf intakte Luciferase-exprimierende Zellen zurückzuführen (Feeney *et al*, 2016). Dies ermöglichte die Etablierung eines Mikrotiterplatten-basierten Assays zur Quantifikation der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber Luciferase-exprimierenden Organoiden. Lumineszenz-basierte Analysen erfolgten in schwarzen 96-Well-Platten mit optischen Böden, welche durch Streulicht verursachten *Crosstalk* zwischen benachbarten Vertiefungen reduzieren. Zunächst wurde die Stabilität und Sensitivität des Lichtsignals in Abhängigkeit von unterschiedlichen Luciferin-Konzentrationen untersucht, um Parameter (Substrat-Konzentration, Belichtungszeit, Zeit bis zur Stabilisierung des Signals) für die Standardisierung des Protokolls festzulegen. Für nachfolgende Zytotoxizitätsstudien wurden die Platten mit Fibronektin beschichtet und Organoide in Wachstumsmedium ausgesät. Aus

Organoiden generierte Monolayer-Kulturen wurden trypsiniert, gezählt und dienten der Generierung einer Standardkurve. Nach dem Adhären der Zellen wurde das Medium durch 100 µl Luciferin-haltiges Medium ersetzt und die Zellen wurden für 30 min im Brutschrank inkubiert. Es folgte die Biolumineszenz-Messung am SpectraMax iD3. Mit Hilfe der Standardkurve konnte nachfolgend die absolute Zellzahl pro Vertiefung bestimmt werden, wodurch die benötigte NK-Zell-Zahl zur Durchführung von Ko-Kulturen mit verschiedenen E/T-Verhältnissen individuell angepasst werden konnte. Die Lumineszenz-Messung wurde zu beliebigen Zeitpunkten wiederholt, sodass die Zellzahl der Organoiden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten ermittelt und somit die NK-Zell-vermittelte Lyse über die Abnahme der Luciferase-Aktivität bestimmt werden konnte.

### 3.6.3 $\beta$ -Galaktosidase Reporterassay

$\beta$ -Galaktosidase aus *Escherichia coli* 1 mg/ml in ddH<sub>2</sub>O

Das *Galacto-Light Plus<sup>TM</sup>  $\beta$ -Galactosidase Reporter Gene Assay* ermöglicht eine Chemilumineszenz-basierte, ultrasensitive Detektion der  $\beta$ -Galaktosidase. Die Quantifizierung von  $\beta$ -Geo in Organoiden erfolgte nach Herstellerprotokoll. Dafür wurden Organoiden dissoziiert, gezählt und in gewünschter Zellzahl in schwarzen 96-Well-Platten mit transparenten Böden ausgesät. Nach dem Adhären der Zellen wurde das Medium verworfen, die Zellen wurden mit DPBS gewaschen und 10 min in Lyse-Puffer inkubiert. Als Kontrolle diente eine Standardkurve aus aufgereinigter  $\beta$ -Galaktosidase, welche ebenfalls in Lyse-Puffer verdünnt und für 10 min inkubiert wurde. Anschließend wurde Galacton-Plus-Substrat mit Reaktionspuffer verdünnt, jeweils 70 µl der 1:100-Verdünnung wurden zu den Zelllysaten und dem Standard gegeben und für 60 min inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl *Accelerator*-Lösung wurde die Platte luminometrisch gemessen.

## 3.7 Immunhistochemie und histochemische Färbungen

Zur Identifizierung und Darstellung bestimmter Gewebestrukturen, Proteinexpressionsmuster und für den Nachweis spezifischer Enzymaktivität an histologischen oder zytologischen Präparaten wurden verschiedene histochemische und immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dabei erfolgte der Nachweis mittels Antikörper (Immunhistochemie) oder mit chemischen Reagenzien, welche subzelluläre Kompartimente anfärben oder als Substrat dienen und somit die spezifische Detektion von Enzymaktivität ermöglichen (Histochemie).

### 3.7.1 Immunhistochemie an Organoiden

Immunhistochemische Färbungen erfolgten für den Nachweis spezifischer Proteine auf Organoid-Schnittpräparaten. Zur Vorbereitung wurden die Organoiden expandiert, nach Erreichen der

gewünschten Konfluenz mit DPBS gewaschen und für 60 min mit Histofix auf einem Wippschüttler inkubiert. Neben der Fixierung resultierte die Inkubation mit PFA in einer partiellen Depolymerisierung des Matrigels, sodass intakte Organoiden ohne enzymatische Dissoziation aus der Basalmembranmatrix extrahiert werden konnten. Die Fixierungslösung wurde in einem 5-ml Reaktionsgefäß gesammelt und nach 10 min von den durch Schwerkraft abgesunkenen Organoiden dekantiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit DPBS, bei welchem die Organoiden nach dem gleichen Verfahren von der Waschlösung getrennt wurden. Zur späteren Identifikation der Organoiden in Paraffin-Blöcken wurden die Organoiden für wenige Sekunden mit Hämatoxylin-Lösung (1:1 verdünnt mit DPBS) bedeckt. Nach dreimaligem Waschen mit DPBS und Dekantieren des Puffers wurden die Organoiden mit 30-50 µl HistoGel versetzt. Durch vorsichtiges Resuspendieren wurden die Organoiden im HistoGel verteilt und anschließend für 15 min auf Eis inkubiert. Das ausgehärtete HistoGel wurde in eine Einbettkassette überführt und bis zur weiteren Verarbeitung in Ethanol bei 4 °C gelagert. Die nachfolgende Dehydrierung der Präparate, das Einbetten in Paraffin sowie die Anfertigung von Mikrotom-Schnittpräparaten, Deparaffinierung, Antigen-Desmaskierung und IHC-Färbung erfolgte durch die Histologie-Core-Facility des Georg-Speyer-Hauses.

### 3.7.2 Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung wird als histopathologische Übersichtsfärbung zur morphologischen Untersuchung und Charakterisierung bestimmter Zellkompartimente angefertigt. Dabei werden der Zellkern und die darin enthaltene DNA durch den Farbstoff Hämatoxylin blau gefärbt. Azidophile Strukturen, wie beispielsweise Plasmaproteine und Komponenten der extrazellulären Matrix, werden durch eine Gegenfärbung mit Eosin rot kontrastiert. H&E-Färbungen wurden mit Färbeautomaten in der Histologie-Core-Facility des Georg-Speyer-Hauses angefertigt.

### 3.7.3 X-Gal-Färbung

Fixierungslösung:	2 % (v/v) PFA, 0,2 % (v/v) Glutaraldehyd in DPBS
Waschpuffer:	2 mM MgCl <sub>2</sub> , 5 mM K <sub>3</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ], 5 mM K <sub>4</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ] in DPBS
X-Gal-Färbelösung:	1 mg/ml X-Gal in Waschpuffer
X-Gal-Lösung (Stock):	100 mg/ml X-Gal in N,N-Dimethylformamid

Die X-Gal-Färbung erfolgte zum Nachweis von β-Galaktosidase in genetisch modifizierten eukaryotischen Zellen. Dabei wird das Reagenz 5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl-β-D-Galactopyranosid von β-Galaktosidase hydrolysiert und nach der Oxidation mit Sauerstoff zu einem blauen Farbstoff umgesetzt. Für die Färbung wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und für 5-10 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit DPBS und Waschpuffer wurden die Zellen über Nacht in frisch

angesetzter X-Gal-Färbelösung bei 37 °C inkubiert. Die Färbelösung wurde am nächsten Tag verworfen, die Zellen wurden zweimal mit Waschpuffer gewaschen und anschließend in DPBS überführt. Die Analyse erfolgte mikroskopisch, wobei Aufnahmen mit Hilfe einer Farbkamera angefertigt wurden.

### 3.7.4 Carmine Alum-Färbung

*Carmine Alum*-Färbelösung: 1 g Carmin, 2,5 g Kaliumaluminiumsulfat, unter Sieden in 500 ml ddH<sub>2</sub>O und einem Thymol-Kristall versetzt

Zur Visualisierung des Drüsengewebes wurde eine Kernfärbung mit Carmin durchgeführt, welche dem Nachweis epithelialer Strukturen in *Whole-mount*-Präparaten muriner Brustfettpolster diene. Dafür wurde das abdominale Brustfettpolster entnommen (siehe Abb.3.1), auf einem Objektträger ausgebreitet und für 2 h in Histofix fixiert. Das Präparat wurde mit DPBS gewaschen und über Nacht in *Carmine Alum*-Färbelösung inkubiert. Zur Dehydrierung des Gewebes wurden die Brustfettpolster für jeweils 1 h in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70 %, 95 %, 100 %) inkubiert. Zum Klären des Gewebes erfolgte eine Übernachtinkubation in Xylol. Die Färbung wurde nachfolgend mikroskopisch analysiert.

## 3.8 Tierversuche

Alle durchgeführten Tierversuche erfolgten nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium Darmstadt und gemäß den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes, der Tierschutz-Versuchstierverordnung und der EU-Tierversuchsrichtlinien.

### 3.8.1 Haltung von Mäusen

Mäuse wurden in Makrolonkäfigen mit Filterhaube (Zuchttiere) oder in geschlossenen, einzelbelüfteten IVC-Käfigsystemen (Versuchstiere) bei 22 °C, 55 % relativer Luftfeuchte und einem 14/10-Hell-Dunkel-Rhythmus in der Tierversuchseinrichtung des Georg-Speyer-Hauses gehalten. Dabei wurden die Tiere in Gruppen gehalten und *ad libitum* mit Trinkwasser und Futter versorgt.

### 3.8.2 Zucht der genetisch veränderten Mauslinie CKP

Zur Zucht der genetisch modifizierten CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup> (CKP)-Mauslinie wurde in der Regel jeweils ein Weibchen im geschlechtsreifen Alter (5-30 Wochen) mit einem Männchen (6-30 Wochen) verpaart. Dabei trug eines der Elterntiere wildtypisches Kras (wt/wt), während das andere Tier ein heterozygoten LSL-Kras<sup>G12V</sup> Allel (wt/Kras<sup>G12V</sup>) aufwies. Die Nachkommen wurden mittels PCR-Analyse genotypisiert.

Tab. 3.5 PCR zur Genotypisierung von SKP-Mäusen

Komponente	Menge	Temperatur	Dauer	Anzahl der Zyklen
DNA	2 µl	95 °C	5 min	1
Primer: Kras2F_16B5	1,25 µl	95 °C	60 s	30
NeoF_2B1	1,25 µl	50-65 °C	30 s	
Kras2R_15B9	2,5	72 °C	1 min	
dNTPs, Puffer, Polymerase	12,5 µl Mango Mix	72 °C	5 min	1
ddH <sub>2</sub> O	5,5 µl			

Dabei wurde das wildtypische Allel durch ein PCR-Produkt von 390 bp detektiert, während das transgene Allel durch ein Amplikon von 431 bp nachgewiesen wurde.

### 3.8.3 Subkutane Transplantation von Organoiden

Narkose-Lösung (Überdosis): Ketamin (10%)-Rompun (2 %)-DPBS-Lösung (1:1:2)

Die subkutane Transplantation von Zellen erfolgte zum *in vivo* Passagieren der Organoide in NSG-Mäusen und zur Analyse des *Engraftment* der daraus abgeleiteten *in vivo* Passagen in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen. Dazu wurden dissoziierte Organoide subkutan in die Flanke von 6-12 Wochen alten weiblichen Mäusen injiziert. Nachfolgend wurde in regelmäßigen Abständen der Gesundheitszustand der Tiere kontrolliert und die Tumorgöße mit Hilfe einer Schieblehre ermittelt. Zur Entnahme der Tumoren wurden die Tiere zunächst unter Narkose durch zervikale Dislokation getötet. Die Aufbereitung der Tumoren erfolgte analog der Etablierung von Organoid-Kulturen (siehe Abschnitt 3.3.3.1).

### 3.9 Statistische Analysen

Um signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen festzustellen, wurde der ungepaarte Welch t-Test durchgeführt. Für Korrelationsanalysen wurde der Pearson Korrelationskoeffizient (engl., *Pearson's Correlation Coefficient*, PCC) bestimmt. Die statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Programm Prism 9 (GraphPad). Dabei wurden p-Werte von < 0,05 als statistisch signifikant erachtet. Signifikanzen wurden wie folgt gekennzeichnet: \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01; \*\*\*: p < 0,001; \*\*\*\*: p < 0,0001.

## 4. Ergebnisse

Das Mammakarzinom ist die häufigste geschlechtsspezifische Krebserkrankung. Etwa 20-25 % der Brustkrebspatientinnen haben dabei Tumoren, die eine Überexpression der Rezeptor-Tyrosinkinase ErbB2 (HER2, *Human epidermal growth factor receptor 2*) aufweisen (Schlam & Swain, 2021). Zwar konnten mit immuntherapeutischen Ansätzen wesentliche Fortschritte in der Behandlung des ErbB2-positiven Mammakarzinoms erzielt werden, allerdings werden Therapieerfolge bei Patientinnen in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung nur selten verzeichnet. Zudem wurden Resistenzmechanismen beobachtet, welche die derzeitigen Behandlungskonzepte limitieren. Dies verdeutlicht die weiter bestehende Notwendigkeit innovativer Therapieansätze.

Die in dieser Arbeitsgruppe generierte NK-Zelllinie NK-92/5.28.z exprimiert einen chimären Antigenrezeptor (engl., *Chimeric antigen receptor*, CAR) mit Spezifität für das tumorspezifische Antigen ErbB2. Die Anti-Tumor-Aktivität dieser Zelllinie konnte bereits in unterschiedlichen *in vitro* und *in vivo* Modellen validiert werden. Immunkompetente Mäuse mit subkutan oder orthotop applizierten ErbB2-exprimierenden Glioblastom-Zellen zeigten nach der Behandlung mit CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen zu einem großen Teil eine vollständige Remission (Zhang *et al*, 2016a, 2017). Darüber hinaus wurde in überlebenden Tieren eine Abstoßung erneut applizierter Tumorzellen (*Rechallenge*) beobachtet, die auf einen immunologischen Langzeitschutz zurückgeht. Die Behandlungserfolge in diesen präklinischen Modellen führten zu einer gegenwärtig laufenden klinischen Studie bei Patienten mit rezidiviertem, ErbB2-positivem Glioblastom (CAR2BRAIN; NCT03383978, clinicaltrials.gov). Da ErbB2 wie oben beschrieben insbesondere beim Mammakarzinom eine wichtige Zielstruktur darstellt, könnte die Behandlung mit CAR-exprimierenden NK-Zellen ein vielversprechender, innovativer Therapieansatz sein und zu einer verbesserten Prognose bei Brustkrebspatientinnen beitragen. ErbB2-spezifische NK-Zellen können Tumorzellen selektiv erkennen und abtöten. Zudem sekretieren sie nach der Aktivierung pro-inflammatorische Zytokine, die das endogene Immunsystem modulieren können. Eine Anti-Tumor-Aktivität der Zelllinie NK-92/5.28.z gegen Brustkrebszelllinien wurde bereits in Zellkulturexperimenten nachgewiesen (Zhang *et al*, 2017). Da Zelllinien in 2D-Kultur die Komplexität und Heterogenität solider Tumoren jedoch nur sehr artifiziell widerspiegeln, war ein Hauptziel dieser Arbeit, murine Mamma-Organoiden zu generieren, welche die Architektur und zelluläre Zusammensetzung ihres Ursprungsgewebes besser rekapitulieren können. Dazu wurden Organoiden aus den Brustdrüsen genetisch modifizierter Mäuse etabliert, die nach lentiviraler Transduktion nicht nur ErbB2 exprimieren, sondern auch genetische Treibermutationen (p53-KO, Kras<sup>G12V</sup>-Expression) tragen und somit die neoplastische Transformation begünstigen. Um die Anti-Tumor-Aktivität der ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zellen analysieren zu können, wurden Assays etabliert, welche die Untersuchung der Zytotoxizität



von Effektorzellen gegen 3D-Kulturen ermöglichen. Weiterhin wurde das *Engraftment* der Organoide in immundefizienten und immunkompetenten Mäusen analysiert. Im Verlauf dieser Arbeit konnten Tumor-Organoide generiert werden, welche die Plastizität einer Krebserkrankung nachbildeten und damit ermöglichten, die CAR-NK-Zell-Aktivität gegen heterogene Brustkrebszellen zu untersuchen.

## 4.1 Etablierung von murinen Mamma-Organoiden

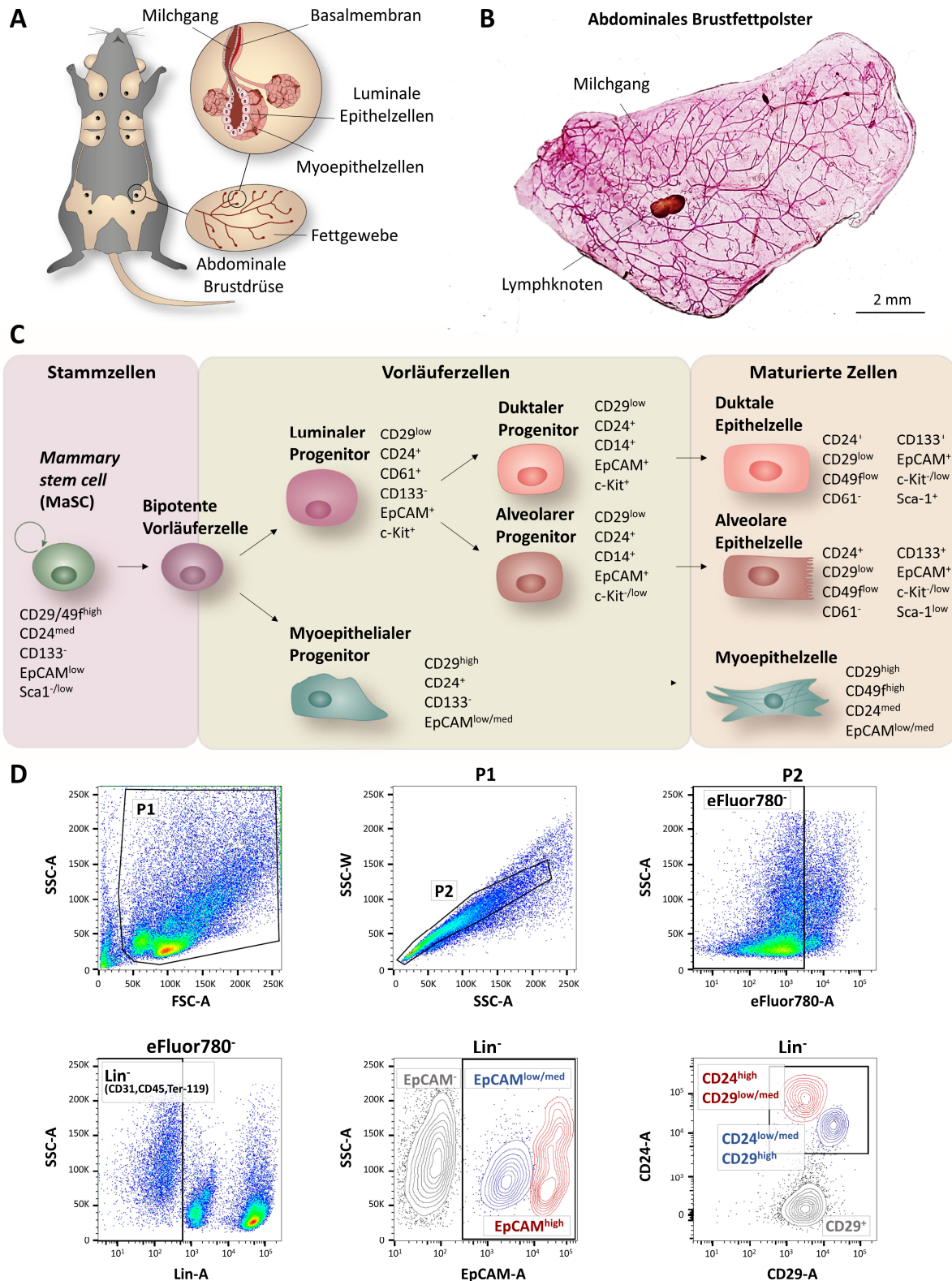
In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein neues Protokoll zur Generierung muriner Organoide des Brustepithels entwickelt. Dafür wurden Einzelzellsuspensionen dissoziierter Brustfettpolster in einer 3D-Basalmembranmatrix (Matrigel) kultiviert, aus welchen Langzeit-Organoid Kulturen abgeleitet werden konnten. Diese Organoide wurden hinsichtlich morphologischer Merkmale und zellulärer Heterogenität untersucht.

### 4.1.1 Anatomie und zelluläre Zusammensetzung des murines Brustdrüsenepithels

Mäuse besitzen fünf Brustdrüsenpaare, die sich während der Pubertät aus rudimentären Drüsengängen zu einem verzweigten Netzwerk aus Milchgängen entwickeln und in Fett- sowie Bindegewebe eingelagert sind (siehe Abb. 4.1 A). Das Auswachsen und die Verzweigung der Drüsengänge wird dabei von terminalen Endknospen (engl., *Terminal end buds*, TEBs) vorangetrieben. Dabei handelt es sich um keulenförmige Gewebestrukturen, die sich am distalen Ende der sich entwickelnden Milchgänge befinden und deren Zellen sich durch ein hohes Proliferationspotenzial auszeichnen. Um die postpubertären Milchgänge zu visualisieren, wurde das abdominale Brustfettpolster einer 9 Wochen alten, nulliparen Maus entnommen und mit Carmin Alum angefärbt (siehe Abb. 4.1 B). Diese *Whole-mount*-Färbung zeigt, dass das Brustfettgewebe geschlechtsreifer Mäuse vollständig von Epithelgängen besiedelt ist und die TEBs sich weitestgehend zurückgebildet haben. Dabei bestehen die differenzierten Drüsengänge aus einer luminalen, glandulären Epithelschicht, die von basalen myoepithelialen Zellen umschlossen und dadurch von der Basalmembran abgegrenzt wird (siehe Abb. 4.1 A). Das Brustepithel zeichnet sich durch ein hohes regeneratives Potenzial aus und durchläuft während einer Schwangerschaft tiefgreifende zelluläre Umwandlungsprozesse. Hormonelle Änderungen fördern die Proliferation und Differenzierung von sekretorischen alveolaren Epithelzellen, die im Zuge der Involution am Ende der Laktationsphase durch programmierten Zelltod (Apoptose) zurückgebildet werden. Die Entstehung und der Erhalt verschiedener Epithelzelllinien wird dabei durch eine heterogene Population von Stammzellen sowie eine Reihe verschiedener Vorläuferzellen gewährleistet. Dies ermöglicht einen zyklisch wiederkehrenden Differenzierungsprozess. Zwar ist die Hierarchie der Epithelzelllinien noch nicht vollständig aufgeklärt, allerdings lieferten Transplantations- und *Lineage Tracing*-Experimente starke Hinweise für die Existenz von multipotenten Stammzellen sowie bipotenten

und unipotenten Vorläuferzellen, sodass ein hypothetisches Modell (siehe Abb. 4.1 C) aufgestellt werden konnte (Visvader & Stingl, 2014; Yang *et al*, 2016a): Adulte multipotente Stammzellen (engl., *Mammary stem cells*, MaSCs) mit Selbsterneuerungsfähigkeit bringen dabei einen gemeinsamen bipotenten Progenitor hervor, der wiederum linienspezifische luminale oder myoepitheliale Vorläuferzellen generieren kann. Weiterhin wurden zwei luminaire Vorläuferzellen beschrieben, die entweder während der Schwangerschaft in alveolare Epithelzellen differenzieren oder den Erhalt der maturierten duktaalen Zellen sicherstellen (Visvader & Stingl, 2014).

Die Expression verschiedener Oberflächenmarker kann bei der Identifizierung und/oder Abgrenzung verschiedener Epithelzell-*Lineages* herangezogen werden (Asselin-Labat *et al*, 2007; Sleeman *et al*, 2007; Visvader, 2009; Visvader & Stingl, 2014; Yang *et al*, 2016a). Beispielsweise kennzeichnet die moderate Expression von CD24 und EpCAM, bei gleichzeitig hoher Expression der Integrine CD29 und CD49f eine Population, welche aus basalen Zellen und einer Anreicherung von MaSCs besteht (Shackleton *et al*, 2006). Der luminaire Differenzierungsweig kann basierend auf der Kombination einer moderaten Expression von CD29 sowie CD49f und hohen Expression von CD24 und EpCAM bestimmt werden (Shackleton *et al*, 2006). Die verschiedenen luminalen *Lineages* können weiterhin durch ein spezifisches Expressionsmuster der Marker CD61, CD133, c-Kit und Sca-1 unterschieden werden. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein Mehrfarben-Panel für die Analyse von Zellen dissoziierter Brustfettpolster entwickelt. Dieses ermöglicht, alle epithelialen Zell-*Lineages* über den Pan-Epithelzell-Marker EpCAM zu identifizieren und weiterhin den luminalen Zweig über die unterschiedlichen Expressionsniveaus der Marker EpCAM, CD24 und CD29 von der basalen, MaSCs angereicherten Population abzugrenzen (siehe Abb. 4.1. D). Für die immunphänotypische Analyse wurde das abdominale Brustfettgewebe einer geschlechtsreifen, weiblichen Maus entnommen und enzymatisch dissoziiert. Die erhaltene Zellsuspension wurde über mehrere Zentrifugationsschritte von Adipozyten befreit und das Epithelzell-haltige Pellet wurde anschließend mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dabei wurden zunächst alle Zellen von kleineren Partikeln sowie Zelltrümmern (P1), Dubletten (P2), toten Zellen (eFluor780<sup>+</sup>) und *Lineage* (Lin)-positiven (CD31, CD45, Ter-119) Zellen diskriminiert. Die daraus resultierende eFluor<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>-Population wurde nachfolgend auf die Expression von EpCAM sowie CD24 und CD29 untersucht. Dabei konnte eine EpCAM<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Population aus Stromazellen, eine EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>-Population aus basalen Zellen und MaSCs, und eine den luminalen Zweig repräsentierende EpCAM<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>CD29<sup>low/med</sup>-Population identifiziert werden. Das somit etablierte Panel wurde im weiteren Verlauf für die Analyse von Primärzellen und abgeleiteten Kulturen des murinen Brustfettpolsters eingesetzt.



**Abb. 4.1 Anatomie und zelluläre Zusammensetzung des murinen Brustfettpolsters.** (A) Schematische Darstellung der Lokalisation und der Anatomie muriner Brustfettpolster. (B) Whole mount Färbung eines abdominalen Brustfettpolsters mit Carmin Alum. (C) Potenzielle Hierarchie muriner Brustepithelzellen mit Oberflächenmarker-Expression zur Klassifizierung der unterschiedlichen Zell-Lineages. (D) Mehrfarben-Panel für die durchflusszytometrische Analyse dissoziierter Brustfettpolster. Epithelzellen können dabei durch die Expression von EpCAM sowie CD24 und CD29 identifiziert werden, wobei sich luminaire (EpCAM<sup>high</sup>CD24<sup>high</sup>CD29<sup>low/med</sup>, rot) von basalen Zellen und MaSCs (EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>, blau) durch spezifische Markerexpressionsmuster unterscheiden lassen. Weitere Erläuterungen im Text.

#### 4.1.2 Anreicherung muriner Brustepithelzellen in 3D-Kulturen

Für die Etablierung muriner Mamma-Organoid-Kulturen wurden verschiedene Ansätze getestet. Zunächst wurde versucht, Epithelzellen des Brustdrüsengewebes durchflusszytometrisch anzureichern (Daten nicht gezeigt). Dafür wurde das abdominale Brustfettpolster in eine Einzelzellsuspension dissoziiert, diese mit Antikörpern markiert und anschließend wurden mit Hilfe des FACS Aria die  $\text{EpCAM}^{\text{low/med}}\text{CD24}^{\text{low/med}}\text{CD29}^{\text{high}}$ - sowie  $\text{EpCAM}^{\text{high}}\text{CD24}^{\text{high}}\text{CD29}^{\text{low/med}}$ -exprimierenden Populationen in separate Auffangröhrchen sortiert. Nur ein geringer Anteil der dissoziierten Zellsuspension entsprach dabei den beiden Populationen (1-3 %), sodass durch FACS-Anreicherung nur begrenzte Zellzahlen (wenige tausend Zellen/Brustfettpolster) sortiert werden konnten. Diese wurden anschließend in Matrigel überführt und mit Kulturmedium zuzüglich Wachstumsfaktoren versetzt. Da die Zellen nach der Isolation und Zellsortierung vollständig vereinzelt vorlagen, wurde das Medium zudem mit einem Rock-Inhibitor (Y27632) versetzt, welcher dem programmierten Zelltod aufgrund von Kontaktverlust zur extrazellulären Matrix (Anoikis) entgegenwirken sollte. Zwar konnten aus  $\text{EpCAM}^{\text{low/med}}\text{CD24}^{\text{low/med}}\text{CD29}^{\text{high}}$ -exprimierenden Zellen Organoide generiert werden, allerdings war die Effizienz hinsichtlich der Anzahl und Generationszeit sehr gering, sodass eine Subkultivierung nicht möglich war.

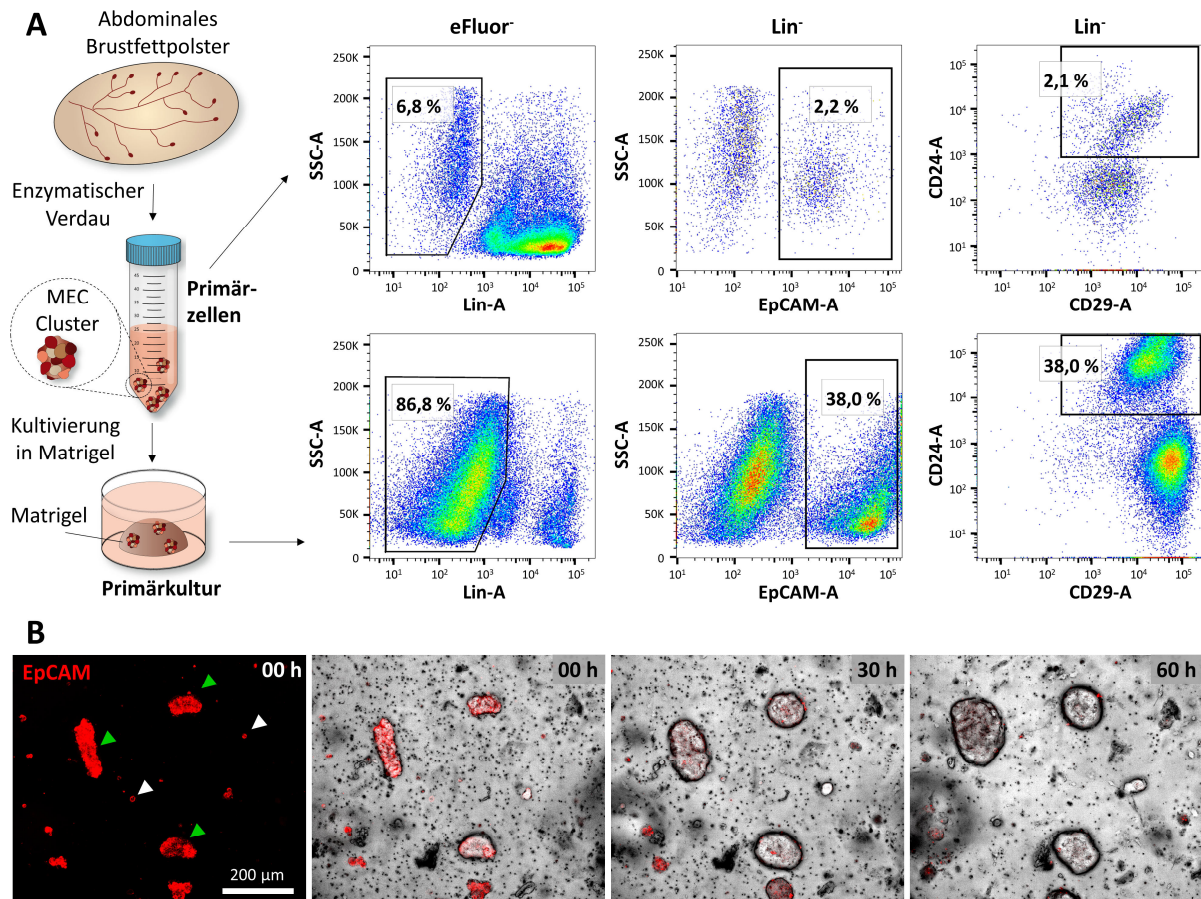
In einem weiteren Ansatz wurde die Verwendung von sogenannten *Feeder*-Zellen erprobt (Daten nicht gezeigt), welche zunächst die Expansion und das Überleben der sortierten Zellen fördern sollte. Die Ko-Kultur mit *Feeder*-Zellen erwies sich in diversen anderen Stammzellkulturen als vorteilhaft, da die Zellen zum einen Zytokine und Wachstumsfaktoren sekretieren, und zum anderen extrazelluläre Matrix-Moleküle zur Verfügung stellen, und damit Überlebenssignale vermitteln (Llames *et al*, 2015). Für die Ko-Kultur mit Mamma-Epithelzellen wurde die murine Fibroblasten-Zelllinie 3T3 getestet. Um die Teilungsfähigkeit dieser schnellwachsenden Linie zu blockieren, wurden die Zellen vor dem Aussäen mit 50 Gray bestrahlt. Anschließend wurden die FACS-angereicherten  $\text{EpCAM}^{\text{low/med}}\text{CD24}^{\text{low/med}}\text{CD29}^{\text{high}}$ - sowie  $\text{EpCAM}^{\text{high}}\text{CD24}^{\text{high}}\text{CD29}^{\text{low/med}}$ -Populationen auf den adhären *Feeder*-Zellen kultiviert. Nach wenigen Tagen konnte in mikroskopischen Untersuchungen eine Expansion der  $\text{EpCAM}^{\text{low/med}}\text{CD24}^{\text{low/med}}\text{CD29}^{\text{high}}$ -exprimierenden Zellen beobachtet werden, welche sich morphologisch von *Feeder*-Zellen abgrenzen ließen. Um zu testen, ob diese Zellen in der Lage sind, Organoide auszubilden, wurden sie geerntet und in Matrigel überführt. Dort konnte nach wenigen Tagen eine Organoid-ähnliche Kultur beobachtet werden, allerdings wiesen diese Zellen keine Proliferation auf.

Aus den vorangegangenen Beobachtungen wurde abgeleitet, dass die geringe Zellzahl, die vollständige Dissoziation oder die fortschreitende Seneszenz die Generierung von multizellulären 3D-Kulturen

erschwerte. Daher wurde in einem weiteren Ansatz die Kultur von aus Brustfettpolstern generierten Zellsuspensionen ohne vorherige Epithelzell-Anreicherung getestet. Die dabei eingesetzten Suspensionen bestanden neben vereinzelt Zellen auch aus unvollständig dissoziierten Zell-Clustern. Diese wurden in Parallelansätzen zum einen auf Collagen-beschichteten Zellkulturschalen (Daten nicht gezeigt) und zum anderen in Matrigel kultiviert (siehe Abb. 4.2). Beim Kultivieren der Zellsuspension auf Collagen-beschichteten Platten konnte in durchflusszytometrischen Messungen eine prozentuale Anreicherung der EpCAM-exprimierenden Zellen von etwa 10 % in der Primärkultur auf 37 % nach Passage 1 beobachtet werden. Zellen aus Passage 2 wurden durchflusszytometrisch angereichert und konnten nach Überführung in Matrigel Organoide ausbilden. Im Parallelansatz, in welchem dissoziierte Einzelzellsuspensionen direkt in Matrigel überführt wurden, konnten Organoiden bereits in der Primärkultur beobachtet werden. Die Zellen wurden aus Matrigel isoliert, enzymatisch vereinzelt, mit Antikörpern gefärbt und anschließend durchflusszytometrisch analysiert. Wie in Abbildung 4.2 A gezeigt, erfolgte innerhalb weniger Tage eine Anreicherung der Primärzellen von ca. 2 % EpCAM<sup>+</sup> bzw. CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup> auf etwa 38 % bei gleichzeitiger Abnahme der *Lineage*-Population (CD31<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup>Ter-119<sup>+</sup>) von etwa 93 % auf 13 %. Diese selektive Anreicherung der Epithel- (EpCAM<sup>+</sup>) und Stromazellen (Lin<sup>-</sup>CD24<sup>-</sup>CD29<sup>+</sup>) erwies sich somit als sehr effizient.

Um tiefere Einblicke in die dynamischen Prozesse der Organoid-Entwicklung zu erhalten, wurde eine mikroskopische Zeitrafferanalyse durchgeführt (siehe Abb. 4.2 B). Dafür wurde das abdominale Brustfettpolster einer weiblichen Maus entnommen und in eine Zellsuspension aufbereitet. Zur Markierung der Epithelzellen wurde die Zellsuspension mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper mit Spezifität für EpCAM gefärbt und anschließend in Matrigel überführt. Ausgewählte Bereiche der Well-Platte wurden anschließend stündlich mit dem konfokalen Laserscanning Mikroskop CQ-1 analysiert. Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglichte es, die Epithelzellen zum Versuchsbeginn zu identifizieren (siehe Abb. 4.2 B, rechts) und über einen Zeitraum von 60 h zu verfolgen. Dabei konnten sowohl stark oder vollständig vereinzelt Epithelzellen als auch größere Zell-Cluster beobachtet werden. Repräsentative Aufnahmen nach 30 h und 60 h zeigten, dass Organoide vor allem aus größeren Epithelzell-Clustern hervorgingen, während stark vereinzelt Zellen über den Zeitraum des Experiments keine erkennbaren 3D-Strukturen bildeten.

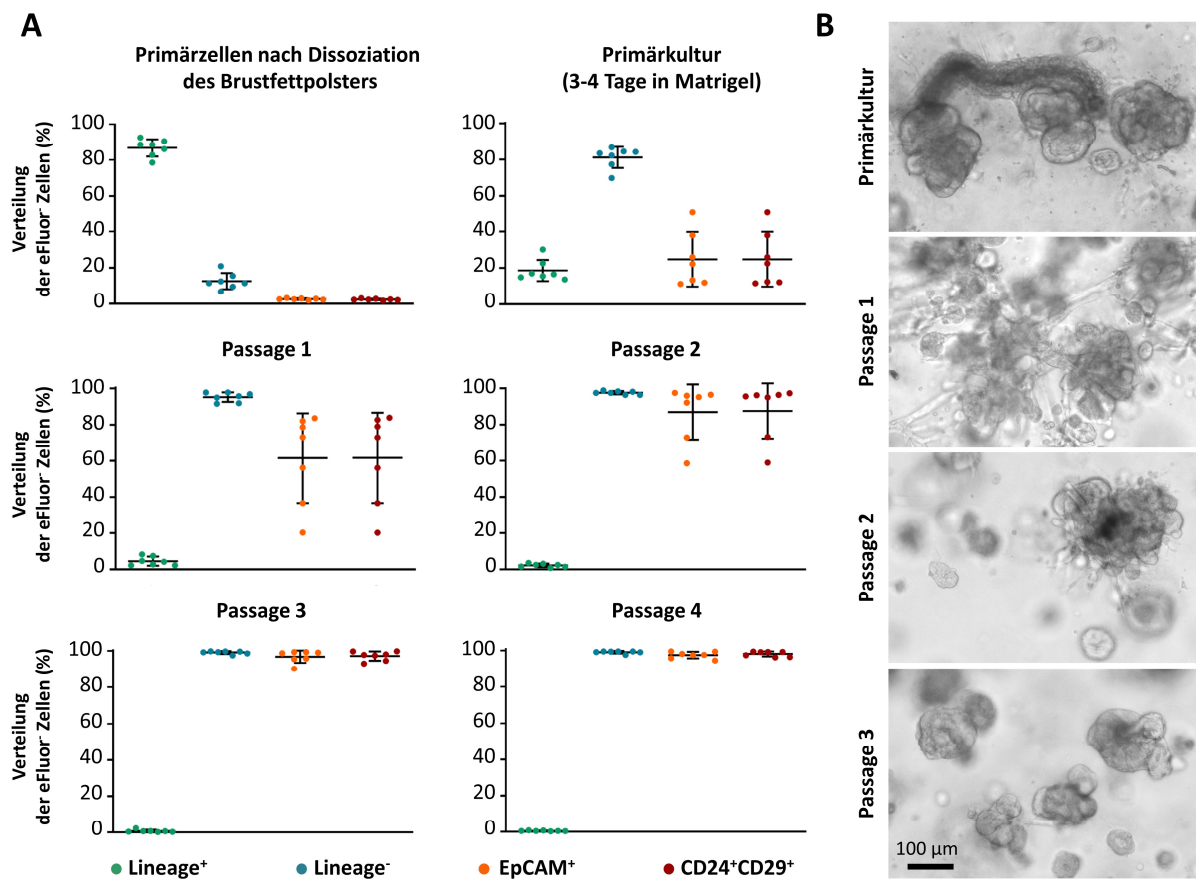




**Abb. 4.2 Primärkultur dissoziierter Brustfettpolster.** (A) Schematische Darstellung und durchflusszytometrische Analyse repräsentativer Einzelsuspensionen eines dissoziierten Brustfettpolsters (oben) und der davon abgeleiteten Primärkultur (unten). Das abdominale Brustfettpolster wurde enzymatisch verdaut, sodass Primärzellen und darin enthaltenden Mamma-Epithelzellen (engl., *Mammary epithelial cells*, MEC) in Matrigel kultiviert werden konnten. Dabei wurden Primärzellen und die Primärkultur durchflusszytometrisch auf die Expression der Oberflächenproteine EpCAM, CD24 und CD29 untersucht. (B) Zeitraffer-Analyse einer aus dem Brustfettpolster generierten Zellsuspension in Matrigel-Kultur mit ausgewählten Aufnahmen nach 0 h, 30 h und 60 h. Epithelzellen wurden mittels Antikörperfärbung markiert (rot). Weiße Pfeile kennzeichnen dabei stark vereinzelt Epithelzellen und grüne Pfeile Epithelzell-Cluster.

Um den Selbstanreicherungsprozess der Primärzellen in Matrigel-Kultur weiter zu verfolgen, wurden daraus abgeleitete Subkulturen durchflusszytometrisch und mikroskopisch untersucht. Dafür wurden Zellen jeder Passage alle 3-5 Tage mikroskopisch dokumentiert, anschließend aus Matrigel isoliert und in einer immunphänotypischen Analyse mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil der *Lineage*<sup>+</sup>-, *Lineage*<sup>-</sup>-, EpCAM<sup>+</sup>- und CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Population bestimmt (siehe Abbildung 4.3 A). Aus sieben Donoren konnte dabei eine prozentuale Anreicherung der EpCAM<sup>+</sup>-Population ermittelt werden, die sich bereits bei Primärzellen durch Kultivierung in Matrigel von 2,6 % ± 0,4 % auf 24,8 % ± 15,0 % steigerte. In den darauffolgenden Subkulturen konnte eine weitere Zunahme von 61,5 % ± 24,8 % der Passage 1 zu 87,0 % ± 15,1 % der Passage 2 bis hin zu über 97 % EpCAM positiver Zellen der weiteren Passagen ermittelt werden. Auch in mikroskopischen Hellsicht-Aufnahmen ausgewählter Passagen (siehe Abbildung 4.3. B) zeigte sich die Generierung einer homogenen Organoid-Kultur. Während in der Primärkultur und Passage 1 noch erhebliche morphologische Unterschiede festgestellt wurden, nahm

die Heterogenität der Folgepassagen ab. Durch serielles Passagieren von dissoziierten Zellsuspensionen des Brustfettpolsters konnte somit ein effizientes und reproduzierbares Protokoll zur Herstellung einer reinen Organoid-Kultur etabliert werden.



**Abb. 4.3 Anreicherung muriner Brustepithelzellen in 3D-Kultur. (A)** Zelluläre Zusammensetzung von Primärzellen und Folgepassagen des murinen Brustfettpolsters. Mittels Durchflusszytometrie konnte die zelluläre Zusammensetzung jeder Passage bestimmt werden. Dafür wurden Einzelzellsuspension des Brustfettpolsters von sieben unabhängigen Donoren gemäß der Expression der Lineage Marker (CD31, CD45, Ter-119), EpCAM, CD24 und CD29 untersucht. **(B)** Morphologie der Primärkultur und ausgewählter Folgepassagen. Die mikroskopischen Aufnahmen zeigen die Anreicherung einer homogenen Mamma-Organoid-Kultur ausgehend von der Primärkultur bis zu Passage 3.

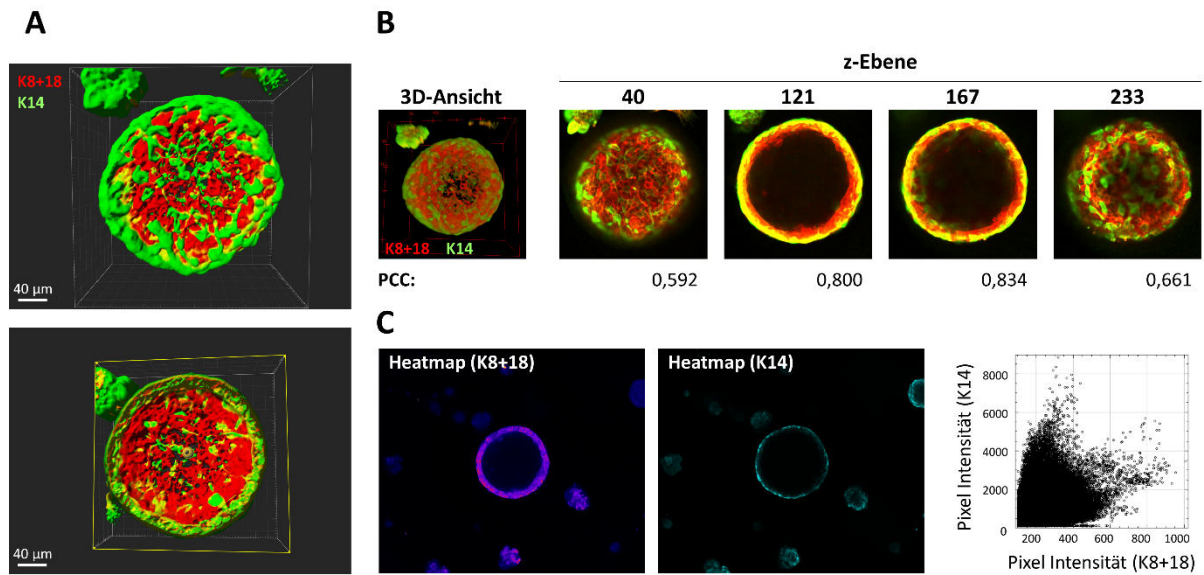
#### 4.1.3 Architektur und zelluläre Heterogenität muriner Mamma-Organoiden

Wie bereits in Abschnitt 4.1.1 beschrieben, bestehen differenzierte Brustdrüsen aus unterschiedlichen Epithelzell-*Lineages*. Neben der Expression spezifischer Oberflächenproteine können diese auch über verschiedene Zytokeratine identifiziert werden. Dabei lassen sich Zellen des luminalen Zweigs beispielsweise über die Zytokeratine K8 und K18 klassifizieren, während die Zytokeratine K5 und K14 hauptsächlich in myoepithelialen Zellen exprimiert werden (Mikaelian *et al*, 2006). In einer mikroskopischen Analyse wurde daher untersucht, ob aus dem unter 4.1.2 beschriebenen Protokoll zur Herstellung von Mamma-Organoiden multizelluläre 3D-Strukturen mit organotypischer Architektur hervorgehen. Dafür wurden reine Epithelzell-Organoid-Kulturen ( $\geq$  Passage 5) in Matrigel fixiert, für die

Antigendemaskierung mit Trypsin behandelt und anschließend mit Antikörpern gegen die Zytokeratine K14 und K8+18 gefärbt. Repräsentative Organoide wurden an einem konfokalen Mikroskop in optischen Schnittserien aufgenommen, diese mit ImageJ zu einem *Stack* zusammengesetzt und mit der Software ImarisViewer zu einer gerenderten Volumengrafik moduliert. In einer Aufsicht (siehe Abb. 4.4 A, oben) und einem Querschnitt der 3D-Volumenrekonstruktion (siehe Abb. 4.4 A, unten) wurden die Zytokeratine 8+18 vor allem in den dem Lumen zugewandten Zellen lokalisiert. Hingegen schien das Zytokeratin 14 vor allem in der äußeren Zellschicht exprimiert zu werden. Dies deutet darauf hin, dass die analysierten Mamma-Organoide aus mindestens zwei verschiedenen Zellschichten bestehen. Wie auch in endogenen Brustdrüsen, sind diese aus einer inneren luminalen, K8+18<sup>+</sup> Epithelzellschicht aufgebaut und werden von myoepithelialen, K14<sup>+</sup> Zellen umschlossen. Weiterhin konnten im Querschnitt der Volumenrekonstruktion Bereiche visualisiert werden, die eine optische Überlagerung der Farbsignale aufweisen. Diese werden unter Verwendung einer roten und grünen *Lookup table* (LUT) als gelbe Voxel dargestellt und liefern erste visuelle Hinweise auf eine Kolokalisation der Zytokeratine.

Um den Grad der Überlagerung zweier Fluoreszenzsignale zu quantifizieren, kann beispielsweise der Pearson Korrelationskoeffizient (engl., *Pearson's Correlation Coefficient*, PCC) berechnet werden. Der PCC bestimmt hierbei die Korrelation zweier Fluoreszenzsignale in korrespondierenden Pixeln und kann Werte zwischen -1 und +1 annehmen. Dabei beschreibt der Wert -1 eine inverse bzw. Anti-Kolokalisation, der Wert 0 keine und der Wert +1 eine vollständige, positive Kolokalisation. Aus einer mit ImageJ generierten 3D-Projektion (siehe Abb. 4.4 B) wurden vier optische Schnittebenen gewählt, von welchen mit Hilfe des Plugin JaCoP (Bolte & Cordelières, 2006) der PCC bestimmt wurde. In allen Schnittebenen konnte dabei ein PCC > 0 ermittelt werden, welcher in den aufeinanderfolgenden Schnittebenen 40, 121, 167 und 233 einen Wert von 0,592, 0,800, 0,834 und 0,661 ergab. Somit wurde in allen Schnittebenen eine hohe Wahrscheinlichkeit der partiellen Kolokalisation nachgewiesen. Zur visuellen Beurteilung wurde ein 2-D-Scatterplot mit Hilfe des Plugin EzColocalization (Stauffer *et al*, 2018) erstellt. Für eine repräsentative Schnittebene (121) wurde der Schwellenwert des Fluoreszenzsignals festgelegt, welcher in einer *Heatmap* für beide Zytokeratine optisch dargestellt ist (siehe Abb. 4.4 C, links). Aus der resultierenden Bildsegmentierung wurde ein *Scatterplot* generiert, der die Intensität beider Farben gegeneinander aufträgt. Die Pixelverteilung des *Scatterplots* weist darauf hin, dass sowohl Bereiche mit als auch Bereiche ohne Kolokalität vorliegen (siehe Abb. 4.4 C, rechts). Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit einige Zellen innerhalb der 3D-Kultur sowohl luminal als auch basale Marker exprimieren und somit bipotente Progenitorzellen oder MaSCs darstellen könnten.

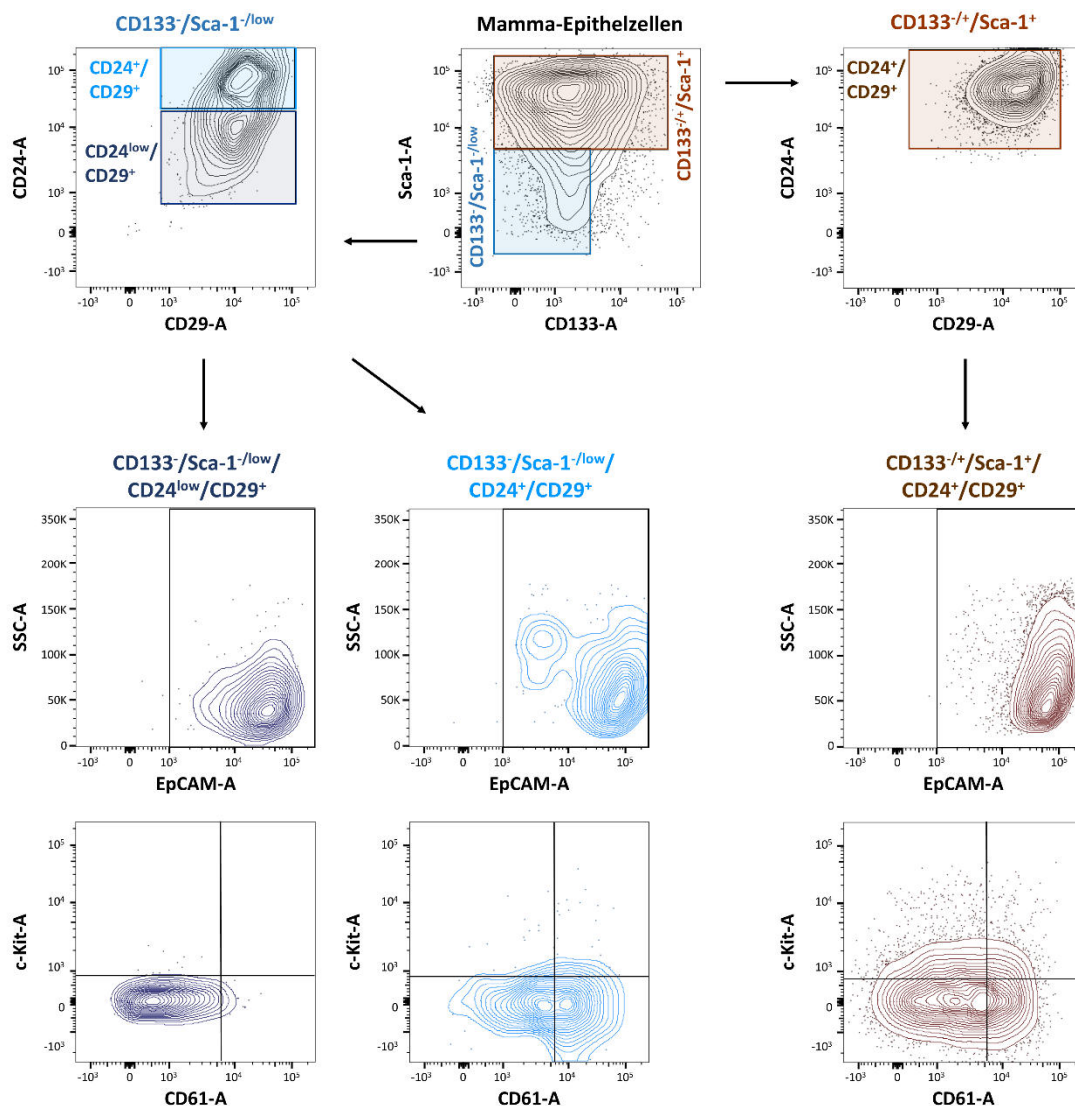




**Abb. 4.4 Aufbau von Organoiden muriner Brustepithelzellen.** Organoide wurden in Matrigel fixiert, mit Antikörpern gegen die Zytokeratin 8+18 (rot) und 14 (grün) gefärbt und anschließend mit einem konfokalen Mikroskop in Schnittserien ( $\leq 1 \mu\text{m}$ ) mit einem 20x *Long Working Distance* Objektiv analysiert. **(A)** 3D-Rekonstruktion einer mikroskopischen Schnittserie. Die Bildserie eines repräsentativen Organoids wurde mit der Software Imaris zu einer gerenderten 3D-Volumen-Rekonstruktion zusammengesetzt. Dargestellt ist eine Aufsicht (oben) und ein Querschnitt (unten) der 3D-Rekonstruktion. **(B)** Kolokalisations-Analyse der Zytokeratine 8+18 und 14. Aus einer 3D-Rekonstruktion (links) wurden vier optische Schnitte gewählt, welche mit Hilfe der Software ImageJ und dem Plugin JACoP einer Kolokalisations-Analyse unterzogen wurden. Die dabei ermittelte räumliche Korrelation der Zytokeratine wird durch den *Pearson's Correlation Coefficient* (PCC) beschrieben. **(C)** *Heatmaps* und 2D-*Scatterplot* der Zytokeratine 8+18 und 14. In einer ausgewählten Schnittebene ( $z=121$ ) wurden die Schwellenwerte der Fluoreszenzsignale festgelegt (*Thresholding*) und in einer *Heatmap* visualisiert. Basierend auf dieser Bildsegmentierung wurde mit Hilfe des ImageJ-Plugins EzColocalization ein 2D-*Scatterplot* generiert, bei welchem die Pixelintensität der beiden Färbungen gegeneinander aufgetragen wurde.

Um die zelluläre Heterogenität der 3D-Kulturen zusätzlich zu bestätigen, wurden Mamma-Organoide ( $\geq$  Passage 5) auf die Expression unterschiedlicher Oberflächenmarker untersucht (siehe Abb. 4.1 C). Dafür wurden die Organoide aus Matrigel isoliert, vereinzelt und mit Antikörpern gegen die Proteine CD24, CD29, CD61, CD133, c-Kit, EpCAM und Sca-1 gefärbt (siehe Abb. 4.5). In der durchflusszytometrischen Analyse erfolgte zunächst die Diskriminierung von Zelltrümmern, kleineren Partikeln sowie Dubletten (Daten nicht gezeigt). Da myoepitheliale Zellen sowie MaSCs keine Expression von CD133 und keine oder eine geringe Expression von Sca-1 aufweisen, wurden die verbliebenen Zellen zunächst auf die Expression dieser Marker untersucht. Dabei konnte eine CD133<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>- und eine CD133<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>-Population identifiziert werden. Es folgte die Analyse der Marker CD24 und CD29. Bei CD133<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>-exprimierenden Zellen wurde eine uniforme Expression dieser Proteine beobachtet, während Zellen mit einem CD133<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>-Phänotyp Unterschiede in der Signalintensität von CD24 zeigten. Um zu untersuchen, ob die CD133<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>CD24<sup>low</sup>CD29<sup>-</sup> und CD133<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen sich hinsichtlich weiterer Marker unterscheiden, wurden diese sowie auch CD133<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen auf die Expression von EpCAM untersucht. Dabei konnten unterschiedliche EpCAM Expressionsniveaus detektiert werden, welche bei CD133<sup>-</sup>Sca-1<sup>low</sup> CD24<sup>low</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen am schwächsten und bei CD133<sup>+</sup>Sca-1<sup>+</sup> CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen am stärksten waren. CD133<sup>-</sup>Sca-1<sup>-</sup>

$CD24^{low}CD29^{+}$ -Zellen zeigten eine Mischpopulation, bestehend aus Zellen mit hoher und Zellen mit moderater EpCAM-Expression. Unterschiedliche Expressionsmuster wurden auch bei der Analyse von c-Kit sowie CD61 beobachtet. Während  $CD133^{+}Sca-1^{low}CD24^{low}CD29^{+}$ -Zellen weder CD61 noch c-Kit exprimierten, enthielt die  $CD133^{-/+}Sca-1^{+}CD24^{+}CD29^{+}$ -Population sowohl  $CD61^{+}$ -Zellen als auch Zellen mit geringer c-Kit-Expression.



**Abb. 4.5 Zelluläre Heterogenität muriner Brustepithelzellen in 3D-Kultur.** Durchflusszytometrische Analyse dissoziierter Organoide. Die Oberflächenexpression der Marker CD24, CD29, CD61, CD133, c-Kit, Sca-1 und EpCAM einer aus Organoiden generierten Einzelzellsuspension wurde durchflusszytometrisch untersucht.

Somit konnte gezeigt werden, dass die generierten Organoid-Kulturen aus unterschiedlichen Epithelzell-*Lineages* aufgebaut sind. Dabei wurden Populationen identifiziert, die dem Expressionsprofil von myoepithelialen Zellen und MaSCs ( $CD133^{+}Sca-1^{low}CD24^{low}CD29^{+}EpCAM^{low}CD61^{-}c-Kit^{-}$ ) entsprachen, aber auch Zellen, die das Expressionsmuster des luminalen Epithels ( $CD133^{-/+}Sca-1^{+}CD24^{+}CD29^{+}EpCAM^{high}$ ) aufwiesen. Weiterhin deuten Unterschiede in der CD61 und c-Kit Expression

darauf hin, dass sowohl luminale Progenitoren als auch vollständig ausdifferenzierte duktale Zellen vorlagen.

#### **4.1.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.1.1 bis 4.1.3**

Die hier beschriebenen Experimente lieferten einen Überblick über die Anatomie und zelluläre Zusammensetzung muriner Brustfettpolster. Basierend auf aktueller Literatur wurden Mehrfarben-Panels etabliert, welche es ermöglichen, Primärzellen sowie Subkulturen dissoziierter Brustfettpolster näher zu analysieren. Diese wurden eingesetzt, um ein effizientes und reproduzierbares Protokoll zur Generierung muriner Mamma-Organoiden zu etablieren. Hierbei wurden dissoziierte Fettpolster in Matrigel kultiviert, was zu einer Selbstanreicherung der Epithelzellen führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die generierten 3D-Kulturen eine organotypische Architektur und zelluläre Zusammensetzung aufweisen.

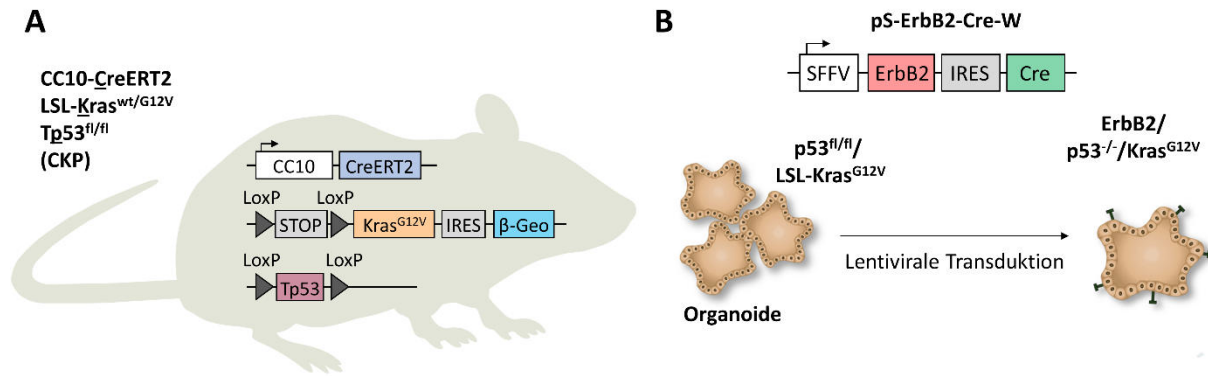
## 4.2 Ableitung und Charakterisierung genetisch modifizierter Mamma-Organoiden

Für die nachfolgende Untersuchung der Anti-Tumor-Aktivität ErbB2-spezifischer CAR-NK-92 Zellen wurden Organoiden generiert, welche den humanen ErbB2-Rezeptor exprimieren und gleichzeitig neoplastische Treibermutationen tragen und dadurch die Karzinogenese in modifizierten Zellen vorantreiben. Entsprechend lentiviral transduzierte Organoiden wurden hinsichtlich genetischer Modifikation sowie morphologischer und molekularer Veränderungen untersucht.

### 4.2.1 Genetische Modifikation zur neoplastischen Transformation von Mamma-Organoiden

Für die Etablierung von Organoiden mit ErbB2-Expression wurden Mamma-Epithelzellen der genetisch modifizierten Mauslinie CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup> verwendet, welche eine konditionale Aktivierung von neoplastischen Treibermutationen ermöglichen (siehe Abb. 4.6 A) (Rosigkeit *et al*, 2021). CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup> (CKP)-Mäuse besitzen ein homozygotes CC10-CreERT Knock-in Allel (Jax<sup>®</sup>: #016225), das unter Kontrolle des CC10-Promotors die konstitutive Expression von CreERT2 in spezifischen Epithelzellen der Lunge vermittelt (Rosigkeit *et al*, 2021). Weiterhin tragen die Tiere ein heterozygotes Kras<sup>LSLG12Vgeo</sup> (Jax<sup>®</sup>: #026924) und ein homozygotes Trp53<sup>fl/fl</sup> Knock-in Allel (Jax<sup>®</sup>: #008462). Mit dem unter Abschnitt 4.1.2 beschriebenen Protokoll wurden Mamma-Organoiden aus Brustfettpolstern von CKP-Mäusen generiert. Organoid-Kulturen wurden auf die Reinheit der Epithelzellen geprüft und die frühestmögliche Passage nach der vollständigen Anreicherung wurde expandiert und für die Etablierung einer Zellbank verwendet.

Für die genetische Modifikation der aus CKP-Mäusen abgeleiteten Mamma-Organoiden wurde ein lentivirales Transferplasmid generiert, welches für humanes ErbB2 kodiert und gleichzeitig die Cre-Rekombinase abhängigen Treibermutationen aktiviert. In einer klassischen Klonierung wurde zunächst eine IRES-Cre Sequenz in ein lentivirales Transferplasmid eingefügt (pS-IRES-Cre) und anschließend wurde mittels *Gibson Assembly* cDNA des humanen ErbB2-Rezeptors integriert (siehe 3.1.7). Das resultierende Konstrukt pS-ErbB2-IRES-Cre (siehe Abb. 4.6. B) vermittelt somit die Ko-Expression von ErbB2 und Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *Spleen focus forming virus* (SFFV)-Promotors. Nach der lentiviralen Transduktion mit dem pS-ErbB2-IRES-Cre-Vektor sollten Mamma-Organoiden des CKP-Modells (p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>) folglich humanen ErbB2-Rezeptor, onkogenes Kras<sup>G12V</sup> und  $\beta$ -Geo exprimieren und gleichzeitig eine Inaktivierung von p53 aufweisen (ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>).

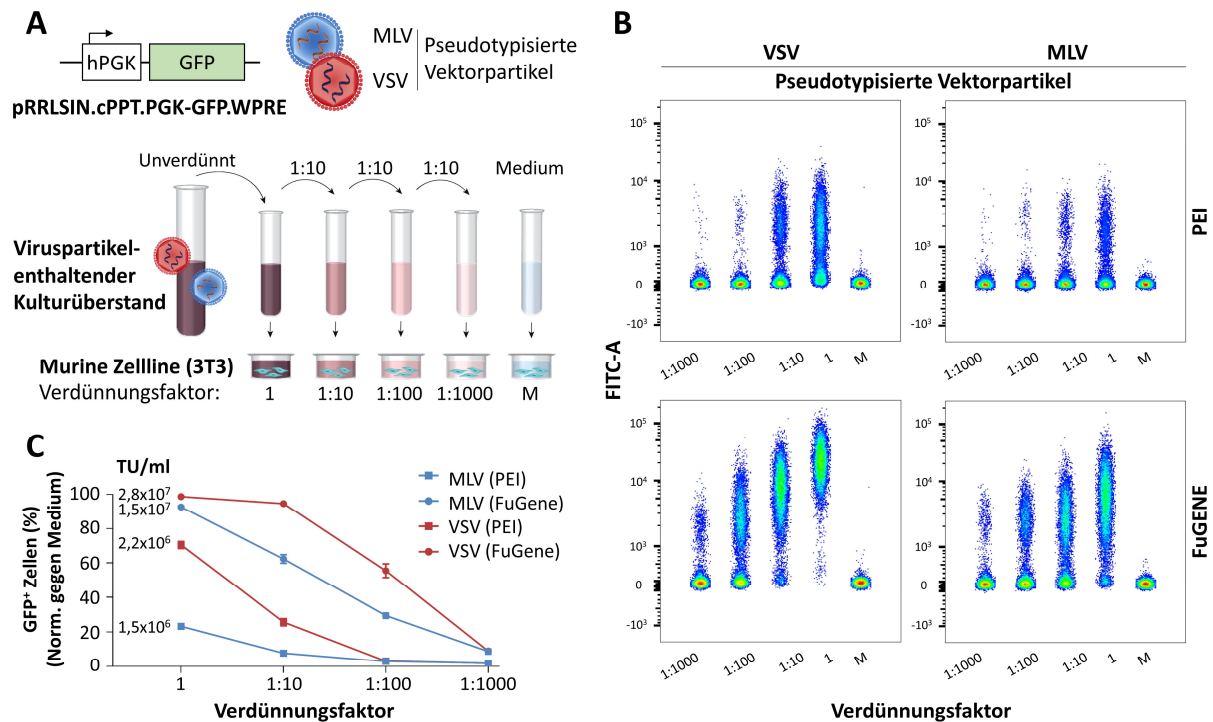


**Abb. 4.6 Generierung muriner Mamma-Organoiden mit neoplastischen Treiber Mutationen.** (A) Schematische Darstellung des genetisch modifizierten CC10-CreERT2Kras<sup>LSL.G12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup> (CKP)-Mausmodells zur Generierung von transformierten Mamma-Organoiden. Das CKP-Modell besitzt konditional induzierbare CreERT2 unter der Kontrolle des CC10-Promoters und ein von LoxP-Sequenzen flankiertes Tp53-Transgen im endogenen Locus. Weiterhin trägt die Knock-In-Mauslinie ein heterozygotes LoxP-STOP-LoxP (LSL)-Kras<sup>G12V</sup>-Allel, welches über eine IRES an die Expression des Reportergens  $\beta$ -Geo gekoppelt ist. (B) Schematische Darstellung der genetischen Modifikation von Organoiden des CKP-Modells. Für die lentivirale Transduktion wurde das pS-ErbB2-Cre-W-Transferplasmid generiert, welches die Ko-Expression des humanen ErbB2-Rezeptors und der Cre-Rekombinase unter Kontrolle des SFFV-Promotors vermittelt. Die Transduktion der CKP-Zellen (p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>) resultiert in der Expression von humanem ErbB2, onkogenem Kras<sup>G12V</sup>, und einem Funktionsverlust von Tp53 (ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>).

#### 4.2.2 Ableitung und Validierung lentiviraler Viruspartikel mit ecotropem Wirtsspektrum

Bei humanem ErbB2 handelt es sich um ein Proto-Onkogen mit transformierendem Potenzial. Zur Verringerung des Sicherheitsrisikos wurde daher getestet, ob sich von HIV abgeleitete lentivirale Partikel mit  $\gamma$ -retroviralen, ecotropen MLV-Glykoproteinen pseudotypisieren lassen und somit ein gerichteter Tropismus für Nagetier-Zellen vermittelt werden kann. Unter Verwendung des lentiviralen Transferplasmids pRRSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE wurden mittels Transfektion von HEK293T/17-Zellen Viruspartikel hergestellt, die entweder mit MLV- oder VSV-G-Hüllproteinen pseudotypisiert waren. Verschiedene Volumina der entsprechenden Vektorpräparationen wurden anschließend in einem Titrationsexperiment für die Modifikation von murinen 3T3-Zellen verwendet (siehe Abb. 4.7 A). Die Transduktionseffizienz konnte durchflusszytometrisch über die Ermittlung des Anteils an GFP<sup>+</sup>-Zellen bestimmt werden. In zusammengesetzten Dotplots sind die Ergebnisse eines repräsentativen Titrationsexperiments gezeigt, in welchem neben den verschiedenen Glykoproteinen auch die Transfektionsreagenzien PEI und FuGENE für die Vektorherstellung getestet wurden (siehe Abb. 4.7 B). Im direkten Vergleich der unterschiedlichen Ansätze konnte in allen Verdünnungen eine gesteigerte Transduktionseffizienz nachgewiesen werden, wenn die Vektorpartikel mit VSV-G Hüllproteinen pseudotypisiert waren. Die Titerbestimmung der verschiedenen Ansätze ergab dabei  $2,8 \times 10^7$  bzw.  $2,2 \times 10^6$  *Transducing Units* (TU)/ml, wenn Vektorpartikel mit VSV-G pseudotypisiert waren und für die Herstellung der Vektoren FuGENE bzw. PEI verwendet wurde. Mit einem Titer von  $1,5 \times 10^7$  (FuGENE) und  $1,5 \times 10^6$  TU/ml (PEI) wurde mit MLV-pseudotypierten Vektorpartikeln eine im Vergleich zu VSV-G verminderte Transduktionseffizienz beobachtet (siehe Abb. 4.7 C). Aus diesen Ergebnissen lässt sich

ableiten, dass die Pseudotypisierung mit dem MLV-Glykoprotein ebenfalls funktionale Viruspartikel hervorbrachte. Zwar wurde eine Reduktion des Vektor-Titers im Vergleich zu VSV-G beobachtet, jedoch ließen sich bei Verwendung des Transfektionsreagenz FuGENE weiterhin ausreichend hohe Titer generieren.



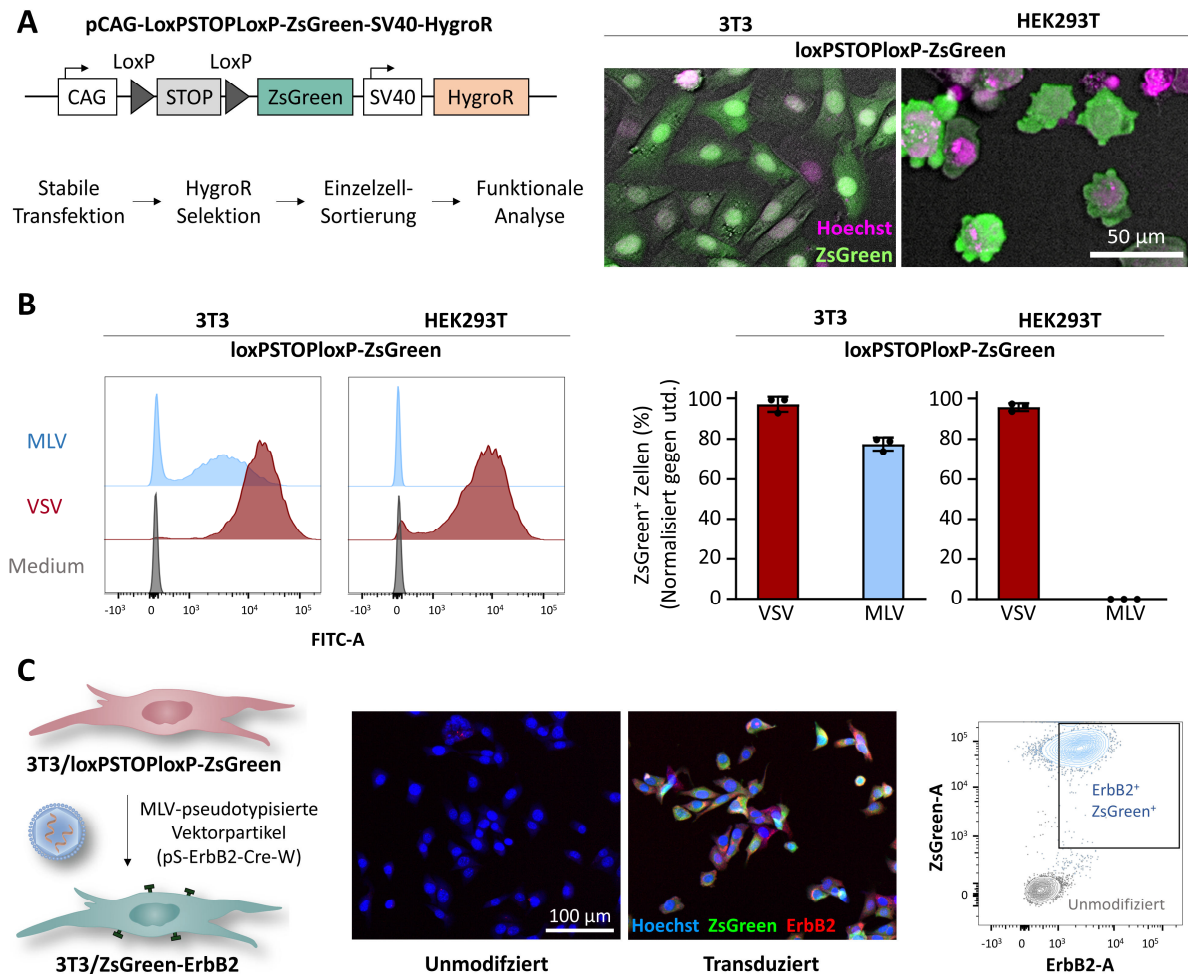
**Abb. 4.7** Etablierung der lentiviralen Transduktion mit MLV-pseudotypisierten Vektorpartikeln. **(A)** Schematische Darstellung eines Titrationsexperiments zur funktionalen Analyse lentiviraler Kulturüberstände mit ecotroper (MLV) und amphotroper (VSV-G) Wirtsspezifität. Für die Generierung von lentiviralen Kulturüberständen wurden HEK293T-Zellen mit einem Drei-Vektor-System ko-transfiziert. Dabei wurde der pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE-Vektor als Transferplasmid verwendet, welcher die Expression von GFP unter Kontrolle des hPGK-Promotors vermittelt. Die lentiviralen Partikel wurden mit VSV-G oder MLV-Hüllproteinen pseudotypisiert. Für die Titration wurden murine 3T3-Zellen in einer seriellen Verdünnungsreihe mit Viruspartikel-enthaltendem Kulturüberstand versetzt. **(B)** Repräsentative durchflusszytometrische Analyse eines Experiments zur Bestimmung des Titers lentiviraler Kulturüberstände. Die Transfektion von HEK293T-Zellen zur Generierung lentiviraler Partikel wurde mit den Transfektionsreagenzien Polyethylenimin (PEI) oder FuGENE, sowie mit für VSV-G- oder MLV-Hüllprotein kodierenden Helferplasmiden angesetzt. Zielzellen eines Titrationsexperiments wurden durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment, in welchem die Transduktionseffizienz über die Expression des Reportergens GFP im FITC-Kanal gemessen und gegen die unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen wurde. Unmodifizierte Zellen, die mit Kulturmedium versetzt wurden (M), dienen als Kontrolle. **(C)** Bestimmung der Transduktionseffizienz lentiviraler Kulturüberstände. Dargestellt sind die über Durchflusszytometrie ermittelte prozentuale Häufigkeit transduzierter GFP-exprimierender Zellen von drei unabhängigen Titrationsexperimenten und die daraus ermittelten *Transducing Units* (TU)/ml.

Für die vorangegangenen Titrationsexperimenten wurde ein Transferplasmid eingesetzt, welches lediglich für das Markerprotein GFP kodierte. Daher wurde nachfolgend untersucht, ob MLV-pseudotypisierte Vektorpartikel auch größere Sequenzabschnitte verpacken können. Dafür wurde das für die genetische Modifikation von Organoiden vorgesehene Plasmid pS-ErbB2-IRES-Cre verwendet. Um die Funktionalität der Cre-Rekombinase zu bestätigen, ein einfaches Testsystem für die Titration von Cre-basierten Vektorsystemen zu etablieren und den Tropismus der MLV-pseudotypisierten



Viruspartikel zu verifizieren, wurden Cre-Reporterzellen generiert (siehe Abb. 4.8 A). Zunächst wurde das eukaryotische Expressionsplasmid pCAG-LoxP-STOP-LoxP-ZsGreen-SV40-HygroR generiert, welches eine von LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette *upstream* des Reportergens ZsGreen aufweist und unter Kontrolle des CAG-Promotors steht. Weiterhin kodiert das Plasmid für ein Hygromycin-Resistenzgen unter Kontrolle des Simian-Virus (SV)40-Promotors. Das Plasmid wurde für die stabile Transfektion von murinen 3T3-Zellen und humanen HEK293T-Zellen verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit der durch eine *Killing-Curve* ermittelten optimalen Hygromycin-Konzentration (500 µg/ml) selektioniert. Nach Einzelzellsortierung konnten monoklonale Zelllinien abgeleitet werden, welche funktional charakterisiert wurden. Unter Verwendung des lentiviralen Transferplasmids pRRSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE (siehe Abschnitt 2.9) wurden VSV-G pseudotypisierte Vektorpartikel hergestellt und für die Transduktion der Cre-Reporterzellen verwendet. In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde von jeder Zelllinie der Klon bestimmt, der nach der Transduktion die höchste Expression von ZsGreen aufwies (Daten nicht gezeigt). Die Funktionalität und Expression der loxPSTOPloxP-ZsGreen-Sequenz in den ausgewählten Zelllinien wurde zudem in einer mikroskopischen Analyse über die grüne Fluoreszenz der transduzierten 3T3- und HEK293T-Reporterzellen bestätigt (siehe Abb. 4.8 A).

Die Zellen wurden anschließend verwendet, um den Tropismus von MLV- und VSV-G-pseudotypisierten Viruspartikeln zu untersuchen. Dafür wurden zunächst Vektorpartikel produziert, welche wie oben beschrieben, nur die Expression von Cre vermitteln. 3T3<sup>-</sup> und HEK293T/loxPSTOPloxP-ZsGreen-Zellen wurden transduziert und durchflusszytometrisch auf die Expression des Reportergens untersucht (siehe Abb. 4.8 B). Die Funktionalität der MLV und VSV-G pseudotypisierten Vektorpartikel konnte durch die Transduktion von 3T3-Cre-Reporterzellen validiert werden, von welchen nachfolgend 77 % ± 3 % (MLV) bzw. 97 % ± 3 % (VSV-G) der Zellen das Reportergen ZsGreen exprimierten. Im Gegensatz dazu lag die Transduktionseffizienz der HEK-Zellen bei Viruspartikeln mit VSV-G durchschnittlich bei 96 % ± 2 % und mit MLV-Hüllprotein bei unter 0,1 % ± 0,01 %. Somit konnte gezeigt werden, dass lediglich VSV-G pseudotypisierte Vektorpartikel die Cre-vermittelte Expression des ZsGreen auch in humanen HEK293T-Reporterzellen induzieren konnten, während MLV-pseudotypisierten Viruspartikel einen ecotropen Nagetier-spezifischen Tropismus aufwiesen. Um nachfolgend die Funktionalität des ErbB2-Cre-Vektors (siehe Abb. 4.6 B) zu testen, wurden daher MLV-pseudotypisierte Vektorpartikel hergestellt und für die Transduktion von 3T3/loxPSTOPloxP-ZsGreen verwendet (siehe Abb. 4.8 C). In einer mikroskopischen und durchflusszytometrischen Analyse der transduzierten Zellen konnte dabei die Ko-Expression von ErbB2 und ZsGreen festgestellt werden.



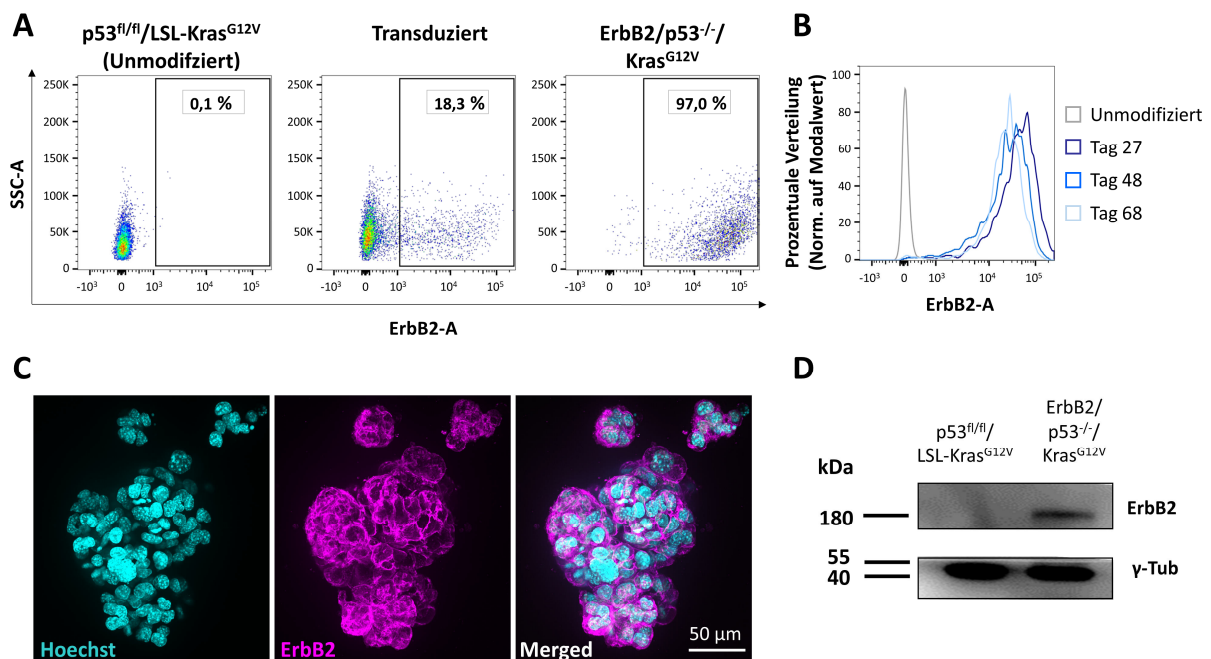
**Abb. 4.8 Generierung und funktionale Analyse von Reporterzellen zur Aktivitätstestung der Cre-Rekombinase. (A)** Herstellung und funktionale Validierung von Cre-Reporterzellen. Für die Herstellung von Cre-Reporterzellen wurde das eukaryotische Expressionsplasmid pCAG-LoxPSTOPLoxP-ZsGreen-SV40-HygroR generiert (links). *Upstream* des Reportergens ZsGreen befindet sich eine von LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette. Weiterhin enthält der Vektor die kodierende Sequenz eines Hygromycin-Resistenzgens, welches vom SV40-Promotor gesteuert wird. Zielzellen wurden mit dem Expressionsplasmid transfiziert und mit Hygromycin B selektioniert. Mittels FACS konnten monoklonale Zelllinien generiert werden, welche zum funktionalen Nachweis mit einem für Cre-Rekombinase kodierenden Vektor (pRRLSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE) transduziert wurden. Mikroskopische Aufnahmen zeigen eine repräsentative monoklonale 3T3<sup>-</sup> und HEK293T/loxPSTOPLoxP-ZsGreen-Zelllinie nach der genetischen Modifikation (rechts). Dafür wurden transduzierte Zellen fixiert, mit Hoechst einer Zellkernfärbung unterzogen (magenta) und anschließend auf die Expression des Reportergens (grün) untersucht. **(B)** Funktionale Analyse MLV- und VSV-G-pseudotypisierter Vektorpartikel zur Vermittlung von Cre-Rekombinase-Expression mit gerichtetem Wirtstropismus. 3T3- und HEK293T/loxPSTOPLoxP-ZsGreen-Zellen wurden mit Cre-Rekombinase-exprimierenden Vektorpartikeln modifiziert. Dargestellt ist eine repräsentative durchflusszytometrische Analyse der Reporterzellen nach Transduktion mit MLV- (blau) oder VSV-G-pseudotypisierten Vektorpartikeln (rot) sowie der gegen unmodifizierte (utd.) Zellen normalisierte Mittelwert  $\pm$  SD der prozentualen Verteilung von drei unabhängigen Transduktionsexperimenten (rechts). **(C)** Funktionale Validierung des pS-ErbB2-Cre-Vektors. Murine 3T3/loxPSTOPLoxP-Zellen wurden mit ecotropen Viruspartikeln transduziert. Als Transferplasmid diente pS-ErbB2-IRES-Cre-W, welches nach erfolgreicher Transduktion die Expression von ErbB2 und gleichzeitig die Cre-abhängige Rekombination vermittelt. Nach der Transduktion wurden die Reporterzellen mit einem Antikörper gegen ErbB2 gefärbt. Nicht modifizierte Zellen dienen als Kontrolle. Für die mikroskopische Analyse (Mitte) wurden die Zellen zusätzlich mit Hoechst (blau) gefärbt. Die Ko-Expression von ZsGreen (grün) und ErbB2 (rot) wurde mit einem konfokalen Mikroskop unter Verwendung des 20x *Long Working Distance* Objektivs bestimmt. In einer durchflusszytometrischen Analyse (rechts) sind transduzierte Zellen (blau) und unmodifizierte Zellen (grau) in einem Dotplot dargestellt.

#### 4.2.3 Validierung genetischer Treibermutationen in modifizierten Mamma-Organoiden

Nach Etablierung MLV-pseudotypisierter Vektorpartikel wurden Mamma-Organoiden des CKP-Modells ( $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ ) unter Verwendung des pS-ErbB2-Cre-Vektors genetisch modifiziert. Transduzierte



Zellen wurden durch eine Antikörperfärbung gegen ErbB2 markiert und mittels FACS angereichert. In zwei bis drei Sortierdurchgängen konnte dadurch der anfängliche Anteil von 18,3 % ErbB2 positiver Zellen auf 97 % gesteigert werden (siehe Abb. 4.9 A). Frühestmögliche Passagen (9-12) wurden nach der vollständigen Anreicherung expandiert und für die Etablierung einer Zellbank verwendet. Die transduzierten und mittels FACS angereicherten Mamma-Organoiden (ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>) wurden in regelmäßigen Abständen auf die Expression des Transgens kontrolliert. In ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden, welche 27, 48 und 68 Tage nach der Zellanreicherung auf die Expression von ErbB2 untersucht wurden, wurde dabei eine Expression in 98,5 %, 99,2 % und 98,8 % der Zellen nachgewiesen (siehe Abb. 4.9 B). Somit konnte gezeigt werden, dass das ErbB2-Cre-Konstrukt in das Genom integriert vorlag und in Langzeit-Kulturen stabil exprimiert wurde. Die ErbB2-Oberflächenexpression wurde zudem in einer mikroskopischen Analyse untersucht. Dafür wurden Organoiden in Matrigel fixiert, mittels Antikörper gegen ErbB2 markiert und unter Verwendung des Kernfarbstoffs Hoechst gegengefärbt. In einer Maximumintensitätsprojektion können dabei die einzelnen Zellen innerhalb eines repräsentativen Organoids anhand der Nuklei identifiziert werden. Die Expression von ErbB2 wurde in der Fluoreszenzfärbung auf der Oberfläche der Zelle lokalisiert. Weiterhin wurde eine Immunoblot-Analyse zur Bestätigung der ErbB2 Expression durchgeführt (siehe Abb. 4.9 D). Der Vergleich mit der Ladekontrolle  $\gamma$ -Tubulin zeigte, dass bei gleichen Proteinmengen ErbB2 lediglich in modifizierten Mamma-Organoiden aber nicht in Kontrollzellen detektiert werden konnte. Die dabei ermittelte molekulare Masse von >180 kDa entsprach der für ErbB2 erwarteten Masse von 185 kDa.

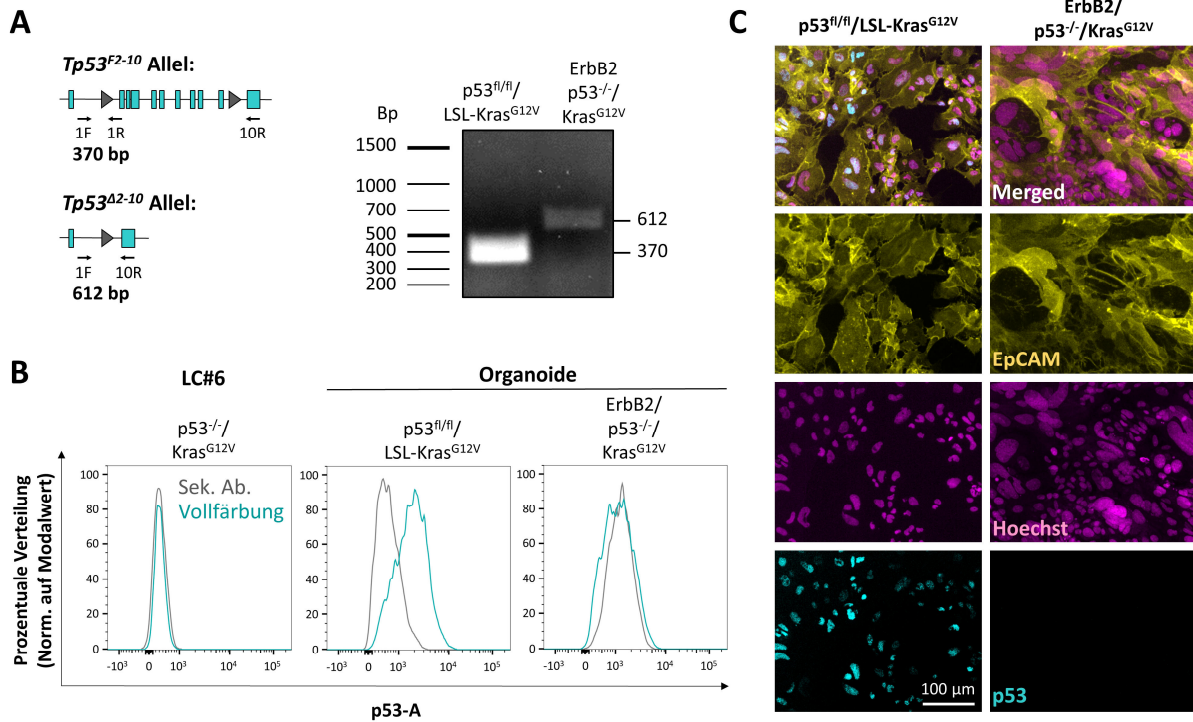


**Abb. 4.9** ErbB2-Expression nach genetischer Modifikation von Mamma-Organoiden des CKP-Mausmodells. **(A)** Anreicherung lentiviral transduzierter Mamma-Organoiden mittels FACS. Organoiden wurden mit MLV-pseudotypisierten Vektorpartikeln modifiziert, welche die Ko-Expression von ErbB2 und Cre-Rekombinase vermitteln. Transduzierte Organoiden wurden dissoziiert, mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen ErbB2 gefärbt und mittels FACS angereichert. Dargestellt ist die

prozentuale Verteilung ErbB2-exprimierender Zellen der unmodifizierten Organoide (links), sowie transduzierter Zellen vor (Mitte) und nach der Zellsortierung (rechts). **(B)** Durchflusszytometrische Analyse der ErbB2-Expression in Langzeitkulturen. Nach FACS-Anreicherung wurden Organoid-Langzeitkulturen zu ausgewählten Zeitpunkten mittels Antikörperfärbung auf die Expression von ErbB2 untersucht. Die ErbB2-Expression wurde durchflusszytometrisch bestimmt und ist in einer Häufigkeitsverteilung abgebildet. Unmodifizierte Zellen dienten als Kontrolle. **(C)** Mikroskopische Aufnahme einer ErbB2-spezifischen Immunfluoreszenz-Färbung. Organoide wurden in Matrigel fixiert, mit einem ErbB2-spezifischen Antikörper und Hoechst gefärbt und anschließend mikroskopisch analysiert. Die Aufnahme mikroskopischer Schnittserien erfolgte bei 60-facher Vergrößerung und ist als Maximumintensitätsprojektion (MIP) dargestellt. **(D)** Analyse der ErbB2-Expression mittels Immunoblot. Je 25 µg Proteinlysate unmodifizierter und transduzierter Organoide wurden unter reduzierenden Bedingungen in einem SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran übertragen. In einer Immunoblot-Analyse erfolgte der Nachweis von ErbB2 und  $\gamma$ -Tubulin durch eine Antikörperfärbung in Kombination mit Spezies-spezifischen, HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern, gefolgt von Detektion mittels Chemilumineszenz-Projektion.

Um nachfolgend die Cre-vermittelte Deletion von p53 zu untersuchen, wurde eine PCR durchgeführt, welche die Detektion des transgenen Tp53<sup>F2-10</sup>- und des deletierten Tp53 <sup>$\Delta$ 2-10</sup>-Allels ermöglichte (siehe Abb. 4.10 A). Das Transgen Tp53<sup>F2-10</sup> besitzt LoxP-Sequenzen in Intron 1 und 10, welche die Exons 2 bis 10 flankieren. Die Cre-vermittelte Rekombination resultiert in einer nahezu vollständigen Deletion der kodierenden p53-Sequenz, sodass lediglich Exon 1 und 11 verbleiben. Durch Verwendung spezifischer Primer kann die 5'-LoxP-Sequenz (Primer 1F + 1R) im Tp53<sup>F2-10</sup>-Allel oder ein Sequenzabschnitt des deletierten p53 (Primer 1F + 10R) nachgewiesen werden (Jonkers *et al*, 2001). Die daraus resultierenden PCR-Produkte unterscheiden sich in der Basenpaarlänge, sodass die Primer 1F, 1R und 10R in einem gemeinsamen Ansatz verwendet werden konnten. Aus p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden wurde DNA isoliert, eine PCR durchgeführt und die PCR-Produkte wurden in einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Bei nicht modifizierten Mamma-Organoiden des CKP-Modells wurde dabei eine spezifische Bande von 370 Basenpaaren (Bp) identifiziert, welche als Nachweis für das geflochte p53-Allel dient. In ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden wurde hingegen ein für das deletierte Allel spezifisches Amplikon von 612 Bp detektiert. Um die Cre-vermittelte Deletion von p53 auch auf Proteinebene nachzuweisen, wurde zunächst eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt (siehe Abb. 4.10 B). Diese erfolgte mittels intrazellulärer Antikörperfärbung gegen p53 in Einzelzellsuspensionen der p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide. Als Positivkontrolle dienten LC#6-Zellen, eine murine Lungenkarzinomzelllinie, welche aus Tumoren einer Tamoxifen-behandelten CKP-Maus generiert wurden (Ernesto Bockamp, nicht publiziert). In der durchflusszytometrischen Analyse konnte p53 in unmodifizierten Mamma-Epithelzellen des CKP-Modells nachgewiesen werden. Dagegen wurde in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen wie auch in LC#6-Zellen kein p53-Signal detektiert. Zusätzlich wurde eine mikroskopische Analyse durchgeführt, welche die vorangegangenen Ergebnisse bestätigen sollte (siehe Abb. 4.10 C). Um einzelne Zellkerne besser identifizieren zu können, erfolgte eine Fluoreszenzfärbung von 2D-Kulturen, die zuvor von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden abgeleitet wurden. Zur Visualisierung des Zellkörpers wurde eine Antikörperfärbung gegen EpCAM durchgeführt. Die Zellen wurden nachfolgend mittels intrazellulärer Antikörperfärbung gegen p53 gefärbt. Mit dem DNA-Farbstoff Hoechst wurden die Nuklei

markiert. Dabei konnte ein p53-Signal in  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen detektiert werden, das wie zu erwarten eine kernständige Lokalisation aufwies. Auch in der mikroskopischen Analyse ließ sich p53 dagegen nicht in  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen detektieren. Somit konnte die erfolgreiche Deletion von p53 in  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen sowohl auf genetischer als auch auf Proteinebene bestätigt werden.



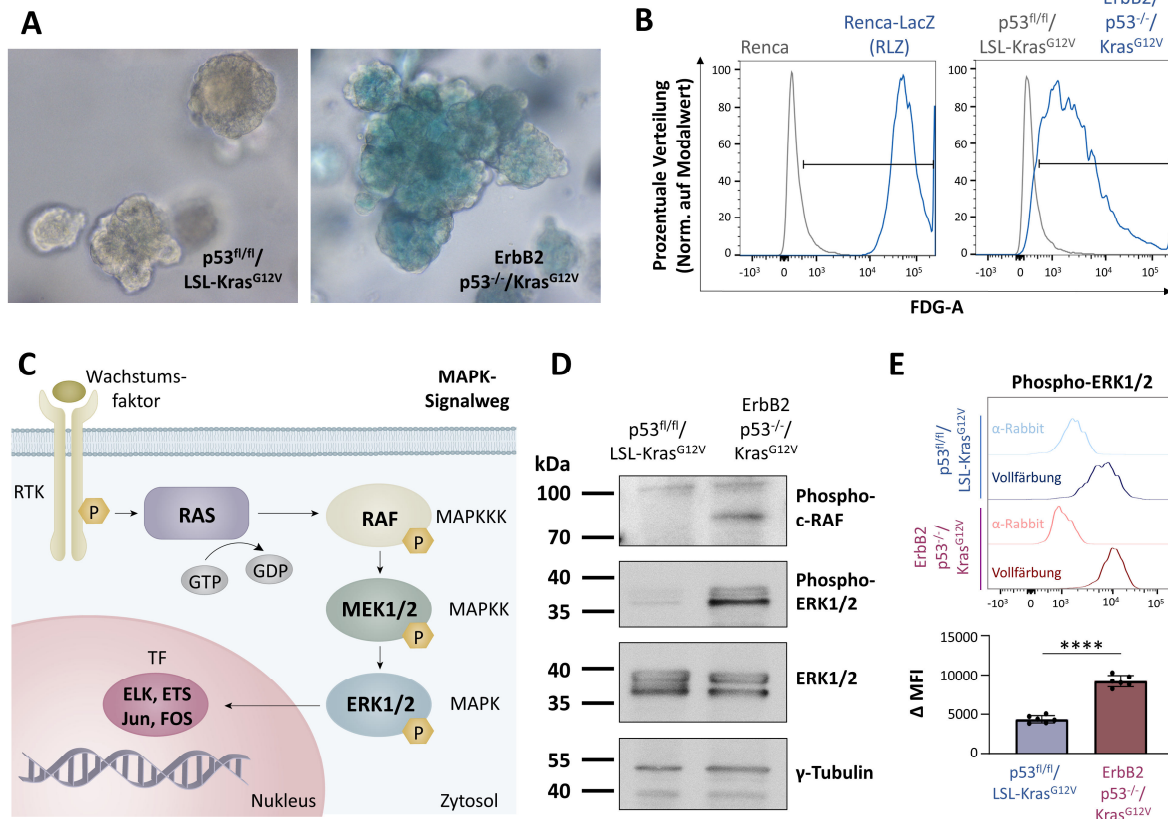
**Abb. 4.10** Deletion von p53 nach genetischer Modifikation von Mamma-Organoiden des CKP-Mausmodells. **(A)** PCR zum Nachweis des transgenen ( $Tp53^{F2-10}$ ) und deletierten ( $Tp53^{\Delta2-10}$ )  $Tp53$ -Allels. Das Transgen  $Tp53^{F2-10}$  besitzt loxP-Sequenzen (graue Pfeile) in Intron 1 und 10. Nach Cre-vermittelter Rekombination entsteht das  $Tp53^{\Delta2-10}$ -Allel, welches eine Deletion der flankierten Exons (türkisfarbene Rechtecke) 2 bis 10 aufweist. In einer PCR kann unter Verwendung spezifischer Primer die 5'loxP-Sequenz (Primerpaar: 1F+1R) im  $Tp53^{F2-10}$ -Allel sowie das  $Tp53^{\Delta2-10}$ -Allel über die Deletion der Exons (Primerpaar: 1F+10R) nachgewiesen werden. Die PCR erfolgte mit den Primern 1F, 1R und 10R und die Produkte wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Unmodifizierte Organoide wiesen dabei ein spezifisches Amplikon bei etwa 370 Basenpaaren (Bp) und modifizierte Organoide ein Produkt bei 612 Bp auf. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse von p53-Protein in unmodifizierten und modifizierten Mamma-Organoiden. Die Expression des funktionalen p53 wurde durch eine intrazelluläre Antikörperfärbung nachgewiesen. Dafür wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, mit einem monoklonalen anti-p53-Antikörper in Kombination mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Als Kontrolle für das deletierte  $p53^{F2-10}$ -Protein wurden aus dem CKP-Modell generierte, Tamoxifen-induzierte Lungenkarzinomzellen (LC#6) mitgeführt. **(C)** Mikroskopische Analyse von p53 in unmodifizierten und modifizierten Mamma-Organoiden. Organoide wurden dissoziiert und als 2D-Kultur in Kammerobjektträgern kultiviert, bevor sie fixiert und einer intrazellulären Immunfluoreszenzfärbung gegen p53 unterzogen wurden. Zur Visualisierung der Zellen erfolgte zudem eine Antikörperfärbung gegen EpCAM (gelb). Die Aufnahmen mikroskopischer Schnittserien erfolgten bei 20-facher Vergrößerung und sind als Maximumintensitätsprojektion (MIP) dargestellt.

Die Validierung der  $Kras^{G12V}$ -Expression erfolgte zunächst indirekt über den Nachweis von  $\beta$ -Geo. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprodukt des lacZ-Reporter- und des Neomycin-Resistenzgens. Wie in Abschnitt 4.2.1 dargestellt, ist  $\beta$ -Geo über eine IRES an  $Kras^{G12V}$  gekoppelt und eignet sich somit als indirekter Reporter für die Expression von onkogenem  $Kras$  nach Cre-vermittelter Rekombination. Die Expression des Reportergens konnte zunächst in einer klassischen X-Gal-Färbung mit anschließender

mikroskopischer Dokumentation an fixierten Organoiden in Matrigel bestätigt werden (siehe Abb. 4.11 A). Dabei wurde die durch  $\beta$ -Galaktosidase vermittelte Hydrolyse des Substrats über einen blauen Niederschlag untersucht, was lediglich in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen detektiert wurde. Um dies auch in lebenden Zellen zu bestätigen, wurde ein durch  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysierter Fluoreszenzfarbstoff nachgewiesen. Dafür wurden p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Einzelzellsuspensionen mit nicht-fluoreszierendem Fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranosid (FDG) inkubiert und nach Abstoppen der Enzymreaktion durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten Renca und Renca-LacZ-Zellen. Nach Zugabe von membranpermeablem FDG wird dieses von  $\beta$ -Galaktosidase-exprimierenden Zellen zu fluoreszierendem Fluorescein hydrolysiert. Entsprechend konnte ein starkes Fluorescein-Signal in Renca-LacZ und in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen detektiert werden, was die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase auch in lebenden Zellen bestätigt.

Da Kras eine wichtige Kontrollfunktion in zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose zugeschrieben wird, wurde nachfolgend der Einfluss von konstitutiv aktiviertem Kras<sup>G12V</sup> auf die Signaltransduktion innerhalb des *Mitogen-activated protein* (MAP)-Kinase-Signalwegs untersucht. Die Aktivierung des kanonischen MAP-Kinase-Signalwegs (siehe Abb. 4.11 C) erfolgt nach Bindung von Wachstumsfaktoren an Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) wie beispielsweise EGFR (engl., *Epidermal growth factor receptor*). Die Stimulation mit EGF führt zur Rezeptordimerisierung sowie Trans- und Autophosphorylierung der intrazellulären Tyrosinreste, die anschließend als Bindestelle für Adaptorproteine fungieren und die GTP-Beladung der kleinen GTPase Ras vermitteln. Aktiviertes Ras-GTP katalysiert eine in Serie geschaltete Phosphorylierungskaskade, die mindestens drei verschiedene und voneinander abhängige Kinasen (MAPKKK, MAPKK, MAPK) umfasst. Im kanonischen MAP-Kinase-Signalweg besteht diese Kaskade aus den Kinasen RAF (MAPKKK), MEK (MAPKK) und ERK (MAPK). ERK-Moleküle können nach der Phosphorylierung in den Kern translozieren und durch Aktivierung spezifischer Transkriptionsfaktoren (TFs) Einfluss auf die Genexpression nehmen. Da mutiertes Kras<sup>G12V</sup> eine beeinträchtigte Hydrolyse von GTP aufweist, führt dies zu einer Ansammlung aktiver Kras-GTP-Moleküle, die somit zu einer aberranten Aktivierung des MAPK-Signalwegs beitragen (Smith *et al*, 2013). Um dies zu überprüfen, wurde eine Immunoblot-Analyse durchgeführt, in welcher die Phosphorylierung der untergeordneten Signalmoleküle c-RAF und ERK1/2 untersucht wurde (siehe Abb. 4.11 D). Zusätzlich wurde die Gesamtmenge an ERK1/2 bestimmt und  $\gamma$ -Tubulin als Ladekontrolle mitgeführt. Dabei konnte in Proteinlysaten von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen mehr phosphoryliertes c-RAF (75 kDa) als in unmodifizierten p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen detektiert werden. Bei vergleichbaren Mengen an ERK1/2-Gesamtproteinen (44/42 kDa) wurde zudem eine gesteigerte Phosphorylierung der beiden Moleküle in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen nachgewiesen. Weiterhin wurde die Phosphorylierung von ERK1/2 durchflusszytometrisch analysiert. In einer Häufigkeitsverteilung einer repräsentativen

Antikörperfärbung konnte dabei ein stärkeres Signal bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 4.11 E, oben). Nach Normalisierung der MFI gegen die Sekundärantikörper-Kontrolle wurde die  $\Delta$  MFI ermittelt (siehe Abb. 4.11 E, unten), welche bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen mit  $10286 \pm 722$  gegenüber p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen mit  $6046 \pm 469$  signifikant erhöht war. Damit konnte gezeigt werden, dass ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen tatsächlich eine höhere Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs aufweisen.



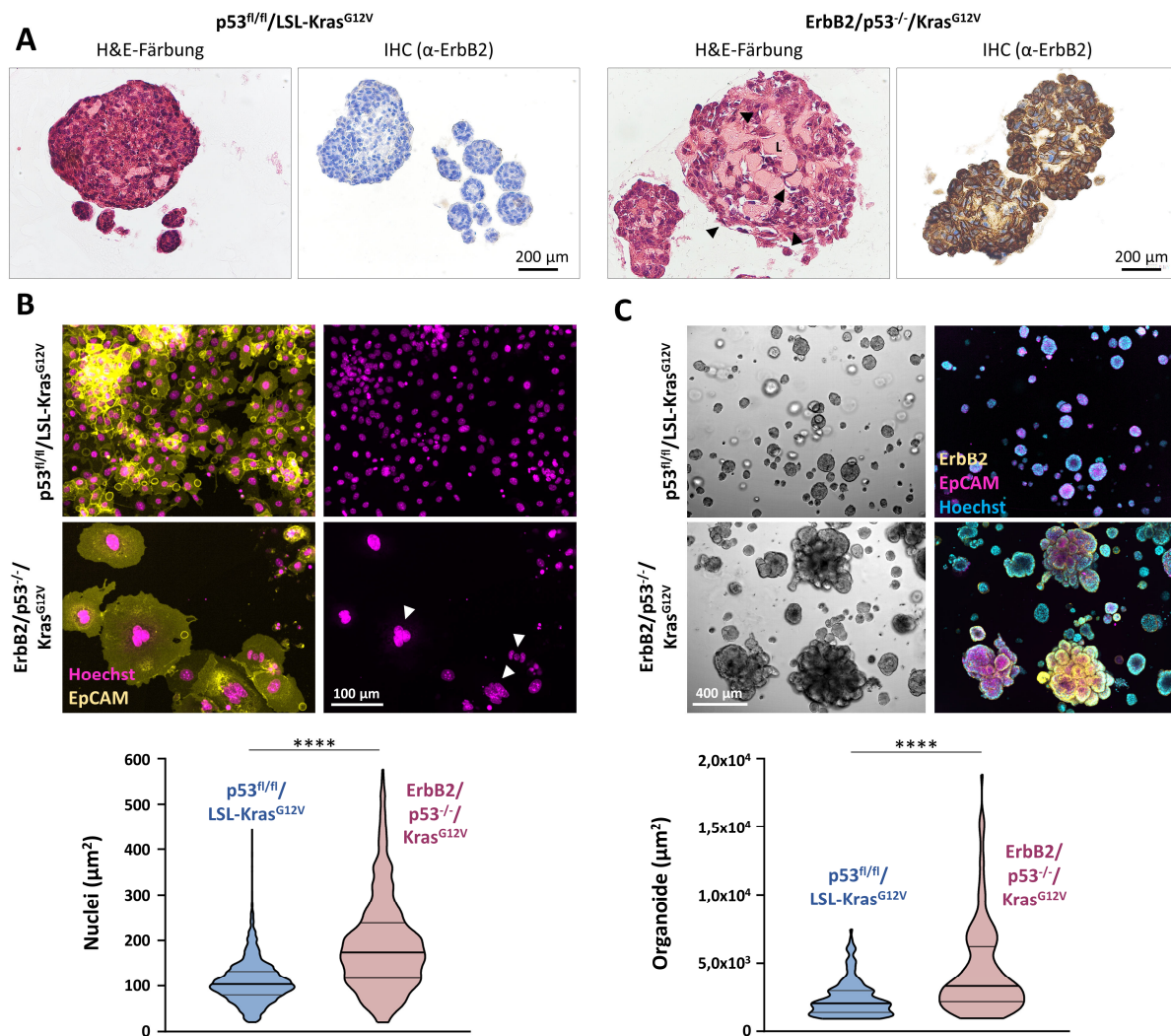
**Abb. 4.11 Kras<sup>G12V</sup>-Expression in modifizierten Mamma-Organoiden des CKP-Modells.** Onkogenes Kras-Protein wurde indirekt über einen Aktivitätsnachweis von  $\beta$ -Geo, dessen Expression über eine IRES an Kras<sup>G12V</sup> gekoppelt ist, sowie über eine gesteigerte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs nachgewiesen. **(A)** X-Gal-Färbung zum mikroskopischen Nachweis der  $\beta$ -Geo-Expression. Organoiden wurden in Matrigel fixiert, einer X-Gal-Färbung unterzogen und anschließend in einem Hellfeldmikroskop bei 20-facher Vergrößerung untersucht. Ein blauer Niederschlag kennzeichnet die Expression von  $\beta$ -Galaktosidase. **(B)** Fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranosid (FDG)-Färbung zum durchflusszytometrischen Nachweis der  $\beta$ -Geo-Expression in lebenden Zellen. Zellen wurden vereinzelt und mit einer 1 mM FDG-Lösung versetzt. Nach einer 20-minütigen Inkubation wurde die Enzymreaktion gestoppt. Aktive  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert FDG zu einem fluoreszierenden Farbstoff, welcher durchflusszytometrisch nachgewiesen wurde. Die murinen Nierenkarzinomzelllinien Renca und Renca-LacZ dienten als Kontrollen. **(C)** Schematische Darstellung des kanonischen MAP-Kinase-Signalwegs. Binden Wachstumsfaktoren an spezifische Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK) führt dies zu einer Aktivierung von Ras. Ras-GTP aktiviert zytosolische MAPKKKs wie Raf und induziert somit eine mehrstufige Phosphorylierungskaskade (MAPKKK-MAPKK-MAPK). Phosphorylierte MAPKs wie beispielsweise ERK1/2 translozieren in den Nukleus und aktivieren untergeordnete Transkriptionsfaktoren (TFs). **(D)** Immunoblot-Analyse phosphorylierter Signalmoleküle des MAPK-Signalwegs. In Immunoblot-Analysen wurden Lysate der unmodifizierten und modifizierten Organoiden mit Antikörpern gegen Phospho-c-RAF, Phospho-ERK1/2 und ERK1/2 untersucht. Als Ladekontrolle diente  $\gamma$ -Tubulin. **(E)** Durchflusszytometrische Analyse von phosphorylierten ERK1/2-Proteinen. Organoiden wurden vereinzelt, fixiert, permeabilisiert und anschließend Antikörperfärbungen gegen Phospho-ERK1/2 in Kombination mit Spezies-spezifischem Fluorochrom-gekoppeltem Sekundärantikörper unterzogen. Dargestellt ist eine repräsentative Häufigkeitsverteilung der durchflusszytometrischen Analyse sowie die Mittelwerte  $\pm$  SD von sechs unabhängigen Experimenten der MFIs nach Subtraktion der Sekundärantikörper-Einzelfärbung ( $\Delta$ MFI). \*\*\*\*: p < 0,0001.



#### 4.2.4 Morphologische und molekulare Veränderungen in modifizierten Mamma-Organoiden

Da neoplastische Treibermutationen die Karzinogenese fördern, wurden ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen hinsichtlich morphologischer und molekularer Veränderungen untersucht, die Indikatoren einer malignen Transformation darstellen können. Dabei ist bekannt, dass transformierte Zellen beispielsweise vergrößerte und unregelmäßige Zellkerne sowie Zellkörper aufweisen (Fischer, 2020). Um mögliche morphologische Veränderungen festzustellen, wurden zunächst histologische Schnittpräparate von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden angefertigt und einer H&E-Färbung bzw. einer IHC-Färbung gegen ErbB2 unterzogen (siehe Abb. 4.12 A). Dabei wurden in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden auffällig große Lumina (L) festgestellt. Weiterhin wurde eine Vergrößerung der Nuklei beobachtet, die sich zudem durch eine heterogene, teilweise langgestreckte bis spindelförmige Morphologie (siehe Abb. 4.12 A, schwarze Pfeile) von Zellkernen der p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden unterscheiden ließen. Um die Veränderung der Zellkern-Morphologie näher untersuchen zu können, wurden 2D-Kulturen angelegt. Der Zellkörper wurde durch eine Antikörperfärbung gegen EpCAM markiert, während die Nuklei mit Hoechst visualisiert wurden (siehe Abb. 4.12 B). Während p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen größtenteils gleichgroße und regelmäßig geformte Zellkerne aufwiesen, konnten bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen stark vergrößerte Nuklei beobachtet werden. Zudem wurden multinukleäre Zellen identifiziert (siehe Abb. 4.12 B, weiße Pfeile), die außerdem durch einen stark vergrößerten Zellkörper auffielen. Um durch Ermittlung der Durchmesser der Zellkerne deren Größe vergleichen zu können, wurden mikroskopische Aufnahmen mit Hilfe von ImageJ prozessiert. Für die Analyse unterschiedlicher Aufnahmen wurde ein Makro erstellt, welches die Erfassung der Zellkerngröße automatisiert (siehe Anhang 2). Benachbarte Nuklei, die nach Anwendung des *Watershed*-Algorithmus keine korrekte Segmentierung aufwiesen, wurden von der Analyse ausgeschlossen. Mit einer durchschnittlichen Zellkerngröße von 190,4  $\mu\text{m}^2$  zeigten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> eine signifikante Vergrößerung gegenüber p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen mit einem durchschnittlichen Nucleus von 109,4  $\mu\text{m}^2$ .

Um weiterhin die Größe von 3D-Kulturen vergleichen zu können, wurden Organoiden vollständig vereinzelt, in gleicher Zellzahl in Matrigel ausgesät und nach fünf Tagen mikroskopisch analysiert (siehe Abb. 4.12 C). Dabei zeigte sich bereits visuell, dass ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden ein größeres Volumen und eine stärkere Verzweigung aufwiesen. Für die Quantifizierung wurden die Aufnahmen in ImageJ prozessiert und die Fläche der Organoiden wurde bestimmt (siehe Anhang 3). Mit einer durchschnittlichen Fläche von 23729  $\mu\text{m}^2$  bei unmodifizierten und 44378  $\mu\text{m}^2$  bei modifizierten Organoiden konnte bei gleichen Kultivierungsbedingungen ein signifikanter Unterschied in der Größe der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden nachgewiesen werden.



**Abb. 4.12 Morphologische Veränderungen genetisch modifizierter Mamma-Organoiden des CKP-Mausmodells. (A)** Histologische Untersuchung von Organoiden. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen (20x) einer H&E- sowie ErbB2-spezifischen IHC-Färbung von unmodifizierten (links) und modifizierten Organoiden (rechts). **(B)** Immunfluoreszenzfärbung von 2D-Kulturen zur Bestimmung der Zellkerngröße. Organoiden wurden dissoziiert und als 2D-Kultur in Kammerobjektträgern kultiviert. Nach drei Tagen wurden die Zellen durch eine Immunfluoreszenzfärbung gegen EpCAM (gelb) markiert, mit Hoechst (magenta) gegengefärbt und fixiert. Schnittserien wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops bei 20-facher Vergrößerung angefertigt. Dargestellt sind repräsentative Maximumintensitätsprojektionen (MIP) (oben). Die Größenbestimmung der Zellkerne (unten) erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Dabei wurden die Aufnahmen des Hoechst-Kanals prozessiert und eine binäre Maske generiert, die es ermöglicht, die Partikel zu analysieren. Dargestellt ist ein Violin-Plot mit Median und Interquartilbereich von Zellkernen aus mindestens drei unabhängigen mikroskopischen Aufnahmen (p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>: n=2290, ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>: n=615). **(C)** Größenbestimmung von Organoiden mittels mikroskopischer Analyse. Organoiden wurden vollständig vereinzelt, in Matrigel ausgesät, fünf Tage später mittels Immunfluoreszenzfärbung gegen ErbB2 (gelb) und EpCAM (magenta) markiert und mit Hoechst (cyan) gegengefärbt. Schnittserien wurden bei 20-facher Vergrößerung mittels konfokaler Mikroskopie dokumentiert und sind als repräsentative MIPs oder als optischer Schnitt (Hellfeld) dargestellt (oben). Die Größenbestimmung der Organoiden (unten) erfolgte mit Hilfe von ImageJ. Aufnahmen des Hellfelds wurden dafür prozessiert und eine binäre Maske diente der Quantifizierung der Größe. Dargestellt ist ein Violin-Plot mit Median und Interquartilbereich von allen Organoiden aus mindestens acht unabhängigen mikroskopischen Aufnahmen (p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>: n=163, ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>: n=170). \*\*\*\*: p < 0,0001.

Neben den festgestellten morphologischen Veränderungen der modifizierten Mamma-Epithelzellen deuten die Größenunterschiede zudem auf eine gesteigerte Proliferation hin. Daher wurden histologische Schnittpräparate von Organoiden angefertigt und mit Hilfe einer IHC-Färbung auf die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht. In repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen

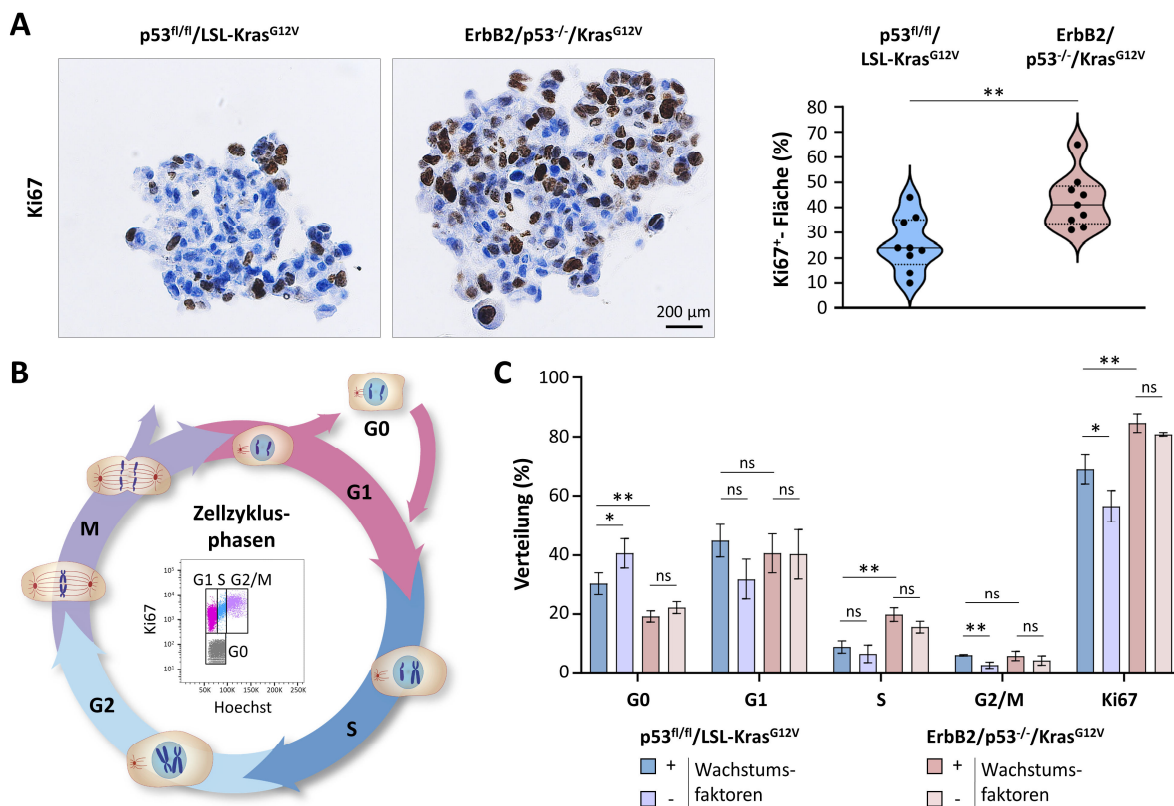
konnte bereits visuell festgestellt werden, dass eine größere Anzahl von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen Ki67 exprimierten (Abb. 4.13 A, links). Zur genaueren Quantifizierung wurde mit Hilfe der Software QuPath zunächst die Gesamtfläche der Organoide bestimmt, die Aufnahmen wurden prozessiert (Brightness/Contrast Adjustment), das Ki67-Signal wurde segmentiert (*Resolution: Full, Channel: DAB, Prefilter: Gaussian, Smoothing sigma: 1, Treshold: 0,15*) und anschließend die Ki67<sup>+</sup>-Fläche innerhalb eines Organoids ermittelt. Während die Ki67-positive Fläche bei unmodifizierten Zellen durchschnittlich 26 % des Gesamt-Organoids ausmachte, konnte bei modifizierten Zellen mit 42 % ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 4.13 A, rechts).

Zur weiteren Untersuchung wurde in einer durchflusszytometrischen Analyse die Verteilung der Zellzyklusphasen bestimmt. Der Zellzyklus kann in vier aufeinanderfolgende Phasen unterteilt werden (siehe Abb. 4.13 B) und beschreibt dabei die Prozesse zwischen zwei Zellteilungen. In der G1-Phase findet die Proteinbiosynthese statt und die Zelle wächst. Die DNA wird im Zuge der Replikation während der S-Phase verdoppelt. In der G2-Phase erfolgen DNA-Reparaturprozesse, die Zelle wächst weiter und die Vorbereitungen für die Zellteilung werden abgeschlossen. Während der M-Phase findet schließlich die Zellteilung statt. Dabei wird jeweils ein diploider Chromosomensatz auf die Tochterzellen übertragen und der Zellkörper wird geteilt. Die Zellen gehen anschließend wieder in die G1-Phase über und können so weitere Zellteilungen vollziehen oder in die Ruhephase (G0) eintreten (Schafer, 1998). In einer durchflusszytometrischen Analyse können ruhende Zellen beispielsweise durch die Abwesenheit von Proliferationsmarkern wie Ki67 identifiziert werden. Alle Ki67-positiven Zellen befinden sich folglich im Zellzyklus und können über den DNA-Gehalt weiter unterteilt werden. Zellen in der G1-Phase haben den geringsten DNA-Gehalt. Während der Replikation in der S-Phase wird dieser verdoppelt. Zellen in der G2/M-Phase besitzen folglich den höchsten DNA-Gehalt können über eine DNA-Färbung nicht weiter unterteilt werden (Eastman & Guo, 2020). Die Zellzyklus-Analyse erfolgte mit 2D-Kulturen, die von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden abgeleitet wurden (siehe Abb. 4.13 C). Da transformierte Zellen in der Regel die Zellteilung von Wachstumsfaktor-vermittelten mitogenen Signalen entkoppeln können (Hanahan & Weinberg, 2011), wurde zudem das Proliferationsverhalten von Zellen untersucht, denen 24 h vor der Analyse die Wachstumsfaktoren EGF, FGF und Insulin sowie FCS und Glutamin entzogen wurden.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen in Medium mit Wachstumsfaktoren ergab dabei eine gesteigerte Anzahl an Ki67-positiven ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen. Während 84,6 % ± 3,1 % der modifizierten Zellen den Proliferationsmarker exprimierten, wurde bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen lediglich ein Anteil von 68,9 % ± 4,5 % ermittelt. Da die G0-Phase durch das Fehlen von Ki67-Expression gekennzeichnet ist, zeigen diese Daten auch, dass ein höherer Anteil der p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen einen teilungsinaktiven Status aufwies. In der S-Phase wurden im Vergleich zu p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen



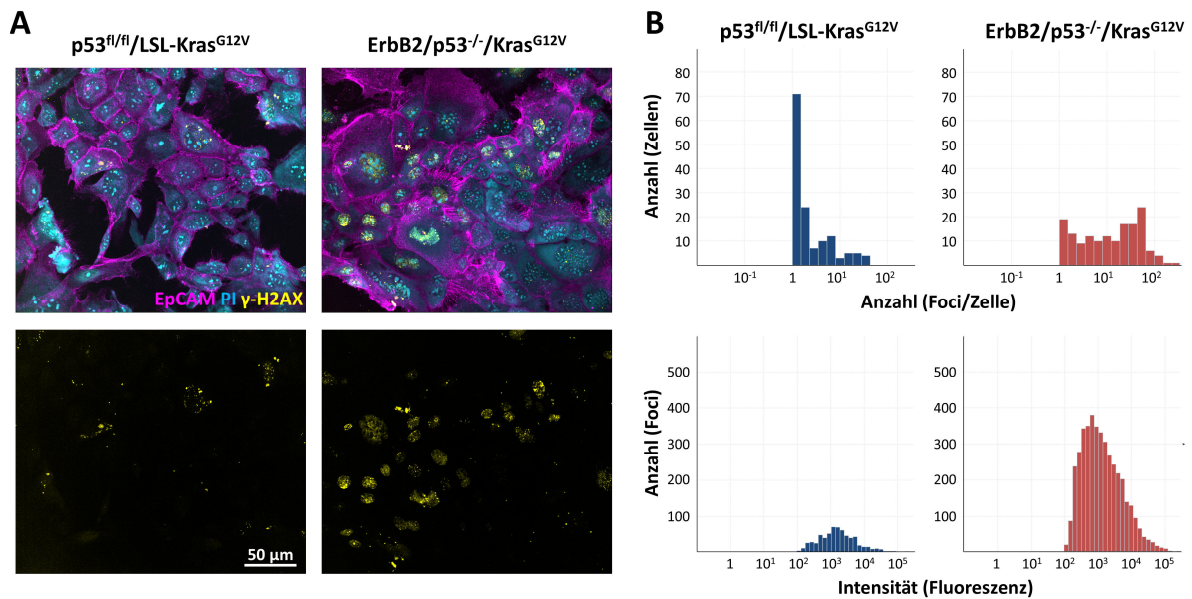
(S-Phase:  $8,9 \% \pm 2,3 \%$ ) etwa doppelt so viele ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ( $19,8 \% \pm 2,3 \%$ ) beobachtet. Hingegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Linien im Anteil an Zellen in der G1- und G2/M-Phase ermittelt. Nach Entzug der Wachstumsfaktoren wurde für ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen in keiner der Zellzyklusphasen ein Unterschied zu Zellen in komplettem Wachstumsmedium festgestellt. Hingegen zeigte sich bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen, die ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, eine Zunahme der Zellen in G0-Phase ( $40,6 \% \pm 4,9 \%$  versus  $30,5 \% \pm 3,6 \%$ ). Weiterhin wurde nach Entzug der Wachstumsfaktoren eine signifikante Abnahme der p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen in der G2/M-Phase ( $2,8 \% \pm 1,1 \%$ ) ermittelt. Im Vergleich zur Kultivierung in komplettem Wachstumsmedium ( $6,2 \% \pm 0,2 \%$ ) befanden sich nur etwa halb so viele Zellen in dieser Phase.



**Abb. 4.13 Ki67-Expression und Zellzyklusanalyse von Mamma-Organoiden des CKP-Modells. (A)** Histologische Untersuchung der Ki67-Expression und Quantifizierung der Ki67-positiven Fläche. Gezeigt sind mikroskopische Aufnahmen einer IHC-Färbung gegen Ki67 (links). Die Quantifizierung der Ki67-positiven Fläche erfolgte mit Hilfe der Software QuPath (rechts). Dafür wurde die Gesamtfläche der Organoiden bestimmt, die Aufnahme prozessiert und ein Schwellenwert des Ki67-Signals festgelegt. Anhand des Schwellenwerts wurde anschließend die prozentual positive Fläche (Ki67<sup>+</sup>) innerhalb der ausgewählten Gesamtfläche (Organoid) bestimmt. Dargestellt ist ein Violin-Plot mit Median und Interquartilbereich von neun mikroskopischen Aufnahmen individueller Organoiden. **(B)** Schematische Darstellung des Zellzyklus mit exemplarischer Phasenverteilung eines durchflusszytometrischen Experiments. In der postmitotischen G1-Phase besitzen Zellen den geringsten DNA-Gehalt, der im Zuge der darauffolgenden S-Phase verdoppelt wird. Während der Mitose (M-Phase) findet die Zellteilung statt, in welcher jeweils ein diploider Chromosomensatz auf die zwei Tochterzellen verteilt wird. Die Zelle geht erneut in die G1-Phase über oder verbleibt in einem Ruhestatus (G0). Dabei können die Zellzyklusphasen mit Ausnahme der G2 und M-Phase anhand der Expression von Proliferationsmarkern (Ki67) und des DNA-Gehalts durchflusszytometrisch analysiert und unterteilt werden. **(C)** Durchflusszytometrische Analyse von 2D-Kulturen zur Bestimmung der prozentualen Verteilung innerhalb des Zellzyklus. Organoiden wurden dissoziiert, als 2D-Kultur für 24 h in AdvancedDMEM<sup>++++</sup> kultiviert und anschließend für weitere 24 h mit frischem Kulturmedium oder in AdvancedDMEM ohne Zusätze (-Wachstumsfaktoren, Glu, FBS) versetzt. Die Zellen wurden geerntet, fixiert, permeabilisiert und mit einem Antikörper gegen Ki67 gefärbt. Vor der

Messung erfolgte die Zugabe von Hoechst. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD aus drei unabhängigen Experimenten. ns:  $p \geq 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Dies zeigt, dass ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen eine höhere Proliferationsrate aufweisen, dabei mehr Zellen in der S-Phase vorzufinden sind und die Zellen im Gegensatz zu unmodifizierten Zellen zumindest zeitweise von Wachstumsfaktoren unabhängig proliferieren können. Da eine verstärkte Proliferation in Kombination mit dem Funktionsverlust von p53 die Akkumulation von DNA-Schäden fördern kann, wurden die modifizierten Organoide auf DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) untersucht. Dafür wurden 2D-Kulturen von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen angelegt und in einer Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen  $\gamma$ -H2AX und EpCAM gefärbt. Zellkerne wurden mit PI markiert (siehe Abb. 4.14 A). H2AX ist ein Histon, welches bei Doppelstrangbrüchen phosphoryliert wird, um DNA-Reparaturmechanismen einzuleiten. Die phosphorylierte  $\gamma$ -H2AX-Variante ist somit ein Marker, der es ermöglicht, DNA-DSBs zu identifizieren. Nach Fluorochrom-gekoppelter Antikörpermarkierung sind  $\gamma$ -H2AX-Moleküle als Foci zu erkennen. Wie in repräsentativen Aufnahmen gezeigt, wurde eine Akkumulation von DSBs in modifizierten Zellen beobachtet. In einer quantitativen Analyse (siehe Anhang 1) wurde mit Hilfe der CQ1-Software die Anzahl der Foci pro Zelle sowie die Intensität der Foci ermittelt (siehe Abb. 4.14 B, oben). Während ein Großteil der p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen keine oder nur eine geringe Anzahl (1-10) an Foci aufwies, konnte in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen insgesamt eine breitere Verteilung und eine Akkumulation von Foci festgestellt werden. Dabei wiesen viele ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen bis zu 100 Foci auf. In beiden Gruppen zeigten die Foci eine starke Heterogenität der Durchmesser (siehe Abb. 4.14 A) sowie der Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 4.14 B, unten). Dies deutet auf eine Überlagerung der Foci hin, die bedingt durch ihre räumliche Nähe und die begrenzte Auflösung der mikroskopischen Aufnahmen nicht weiter segmentiert werden konnten. Dennoch konnten sowohl visuell als auch in einer quantitativen Analyse insgesamt mehr DNA-DSBs pro Zelle und auch insgesamt mehr Zellen mit DSBs in der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Gruppe ermittelt werden. Dies deutet auf eine für Krebszellen charakteristische chromosomale Instabilität hin und könnte ein Indikator für eine fehlende genomische Integrität der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen sein.



**Abb. 4.14** Detektion von  $\gamma$ -H2AX als Nachweis für DNA-Doppelstrangbrüche in von Mamma-Organoiden des CKP-Modells abgeleiteten 2D-Kulturen. **(A)** Repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen gegen  $\gamma$ -H2AX. Dissoziierte Organoide wurden in Kammerobjektträgern kultiviert, einer Oberflächenfärbung gegen EpCAM (magenta) unterzogen, fixiert, permeabilisiert und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper mit Spezifität für  $\gamma$ -H2AX (gelb) gefärbt. Es folgte eine Gegenfärbung mit Propidiumiodid (PI). Dargestellt sind Maximumintensitätsprojektionen von Schnittserien, die bei 60-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. **(B)** Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci. Mit Hilfe der CQ1-Software wurden die mikroskopischen Aufnahmen segmentiert und eine binäre Maske wurde erstellt, mit deren Hilfe die Anzahl der Foci pro Zelle und die Intensität der Foci ermittelt werden konnte. Dargestellt ist eine Häufigkeitsverteilung der Foci pro Zelle (oben) sowie eine Häufigkeitsverteilung der Foci-Intensität (unten).

#### 4.2.5 Zusammenfassung der Abschnitte 4.2.1-4.2.4

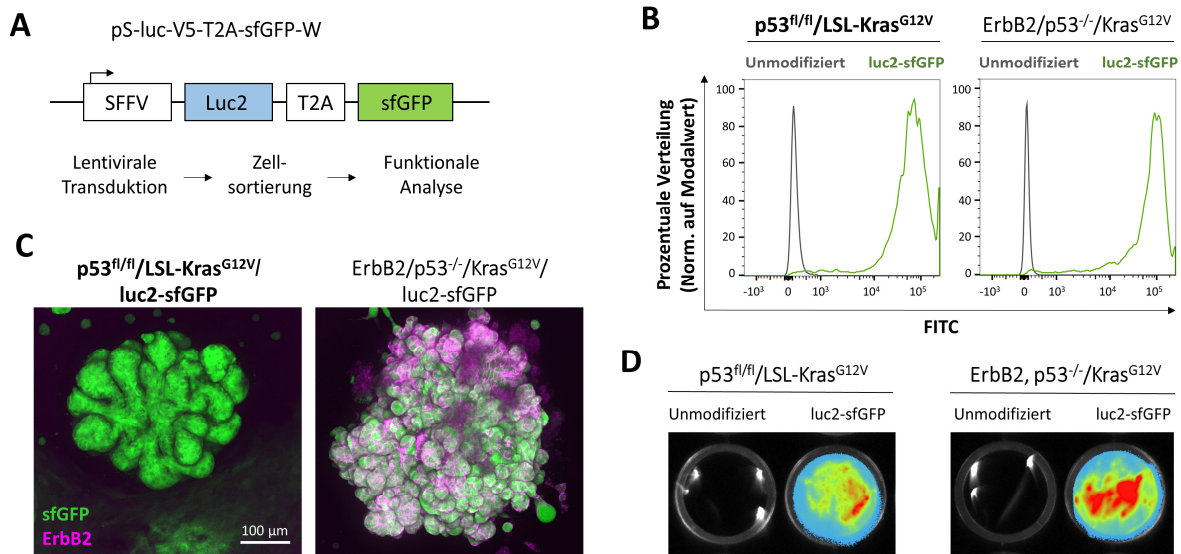
Mit den hier beschriebenen Experimenten wurden Mamma-Organoide aus dem genetisch modifizierten CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup>-Mausmodell generiert. Mit Hilfe von MLV-pseudotypisierten Vektorpartikeln wurden daraus Organoide abgeleitet, die sowohl ErbB2 exprimieren als auch neoplastische Treibermutationen tragen. Dabei konnte der Funktionsverlust von p53 und die Expression von onkogenem Kras<sup>G12V</sup> nachgewiesen werden. Die modifizierten Organoide zeigten im Vergleich zu p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen morphologische Veränderungen, eine gesteigerte Zellteilung, das Potenzial Wachstumsfaktor-unabhängig zu proliferieren, und eine erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen. Dies weist auf eine maligne Transformation der modifizierten Mamma-Organoide hin.

### 4.3 Aktivität ErbB2-spezifischer CAR-NK-Zellen gegen Antigen-positive Mamma-Organotide

Um die zytotoxische Aktivität von ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zellen gegen Mamma-Organotide zu untersuchen, wurden zunächst geeignete Assays etabliert, welche es ermöglichen, die Lyse von Zielzellen in 3D-Kultur zu bestimmen. Da eine FACS-basierte Analyse von Organotiden eine vorausgehende Dissoziation erfordert, können daraus erhaltene Daten hinsichtlich der Vitalität und Gesamtzellzahl fehleranfällig sein. Daher eignen sich durchflusszytometrische Zytotoxizitätsassays nur bedingt dafür, die Lyse von Organotiden nach Ko-Kultur mit Effektorzellen zu bestimmen. Um geeignete und reproduzierbare Zytotoxizitätsassays mit Organotiden durchführen zu können, wurde daher ein Luciferase-basiertes Reporterassay sowie eine mikroskopische Zeitrafferanalyse etabliert. Diese wurden nachfolgend dazu genutzt, die CAR-vermittelte Lyse der Zielzellen sowohl in 2D- als auch in 3D-Kultur zu bestimmen.

#### 4.3.1 Generierung und funktionale Charakterisierung Reporter-gen-exprimierender Mamma-Organotide

Um die NK-Zell-vermittelte Lyse von 3D-Kulturen zu bestimmen, wurden zunächst  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ - und  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen generiert, die durch die Expression von Reporter-genen eine Quantifizierung intakter Organotide ermöglichen. Unter Verwendung des  $pS-luc-V5-T2A-sfGFP-W$ -Transferplasmids (siehe Abschnitt 2.9) wurden die Zellen lentiviral transduziert (siehe Abb. 4.15 A). Das Plasmid kodiert unter Kontrolle des SFFV-Promotors für die Reporter-gene *luc2* und *superfolder GFP* (sfGFP), dessen Ko-Expression über eine T2A-Sequenz gekoppelt ist. Modifizierte Zellen wurden anhand des sfGFP-Signals durchflusszytometrisch angereichert (Daten nicht gezeigt). Die Expression des sfGFP der angereicherten Zelllinien wurden in einer anschließenden durchflusszytometrischen (siehe Abb. 4.15 B) und mikroskopischen Analyse (siehe Abb. 4.15 C) nochmals bestätigt. Dabei zeigten  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}/luc2-sfGFP$  und  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}/luc2-sfGFP$ -Zellen ein starkes Fluoreszenzsignal. Um die Funktionalität der Luciferase zu überprüfen, wurden Reporter-gen-negative und Reporter-gen-positive Organotide vereinzelt, in gleicher Zellzahl in die Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät und mit Luciferin versetzt. Durch Biolumineszenz-Bildgebung konnte anschließend ein spezifisches Signal in Luciferase-exprimierenden Zellen detektiert werden (siehe Abb. 4.15 D).



**Abb. 4.15 Generierung von Reporter-gen-exprimierenden Mamma-Organoiden.** (A) Schematische Darstellung des lentiviralen Transferplasmids pS-luc-V5-T2A-sfGFP-W. Der Vektor kodiert für das Luciferase-Gen luc2, welches über eine T2A an die Expression des Reportergens *superfolder GFP* (sfGFP) gekoppelt ist. Organoide wurden transduziert, mittels FACS auf sfGFP-positive Zellen angereicht und anschließend funktional charakterisiert. (B) Durchflusszytometrische Analyse der sfGFP-Expression in FACS-angereicherten luc2-sfGFP-modifizierten Organoiden. Dargestellt ist eine Häufigkeitsverteilung der modifizierten Organoide (grün). Als Kontrolle dienten unmodifizierte Zellen (grau). (C) Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis der Reporter-gen-Expression in Mamma-Organoiden. FACS-angereicherte Organoide wurden in Matrigel fixiert und mit Fluorochrom-gekoppeltem ErbB2-spezifischem Antikörper (magenta) gefärbt. Dargestellt sind Maximumintensitätsprojektionen von Schnittserien, die bei 20-facher Vergrößerung aufgenommen wurden. (D) Chemilumineszenz-Bildgebung zum Aktivitätsnachweis des Reporters Luciferase. Organoide wurden dissoziiert und jeweils  $5 \times 10^4$  Zellen in die Vertiefung einer 96-Well-Platte ausgesät. Nach Zugabe des Substrats Luciferin erfolgte die Dokumentation der Lumineszenz am Fusion FX7 bei einer Belichtungszeit von 30 sec.

#### 4.3.2 CAR-NK-Zell-Aktivität gegen dissoziierte Mamma-Organoide

In einem vereinfachten durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassay wurde zunächst die Sensitivität dissoziierter p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen gegenüber NK-92 Zellen untersucht. Um die Anti-Tumor-Aktivität der parentalen und CAR-exprimierenden NK-92 Zellen zu überprüfen wurde zunächst eine 2-stündige Ko-Kultur mit der erythroleukämischen Zelllinie K562 sowie den humanen Brustkrebszelllinien MDA-MB453 (ErbB2<sup>+</sup>) und MBA-MB468 (ErbB2<sup>-</sup>) durchgeführt (siehe Abb. 4.16 A). Sowohl parentale als auch CAR-exprimierende NK-92 Zellen zeigten eine vergleichbare Lyse der MHC-I-negativen K562-Zellen, welche auf die natürliche Zytotoxizität der Effektorzellen zurückzuführen ist. Erwartungsgemäß zeigten ErbB2-negative MDA-MB468 in Ko-Kultur mit den NK-Zellen keine erhöhte Lyse. Im Gegensatz hierzu wurde jedoch ein gesteigertes ErbB2-spezifisches Abtöten von ErbB2-überexprimierenden MDA-MB453-Zellen durch NK-92/5.28.z Zellen beobachtet.

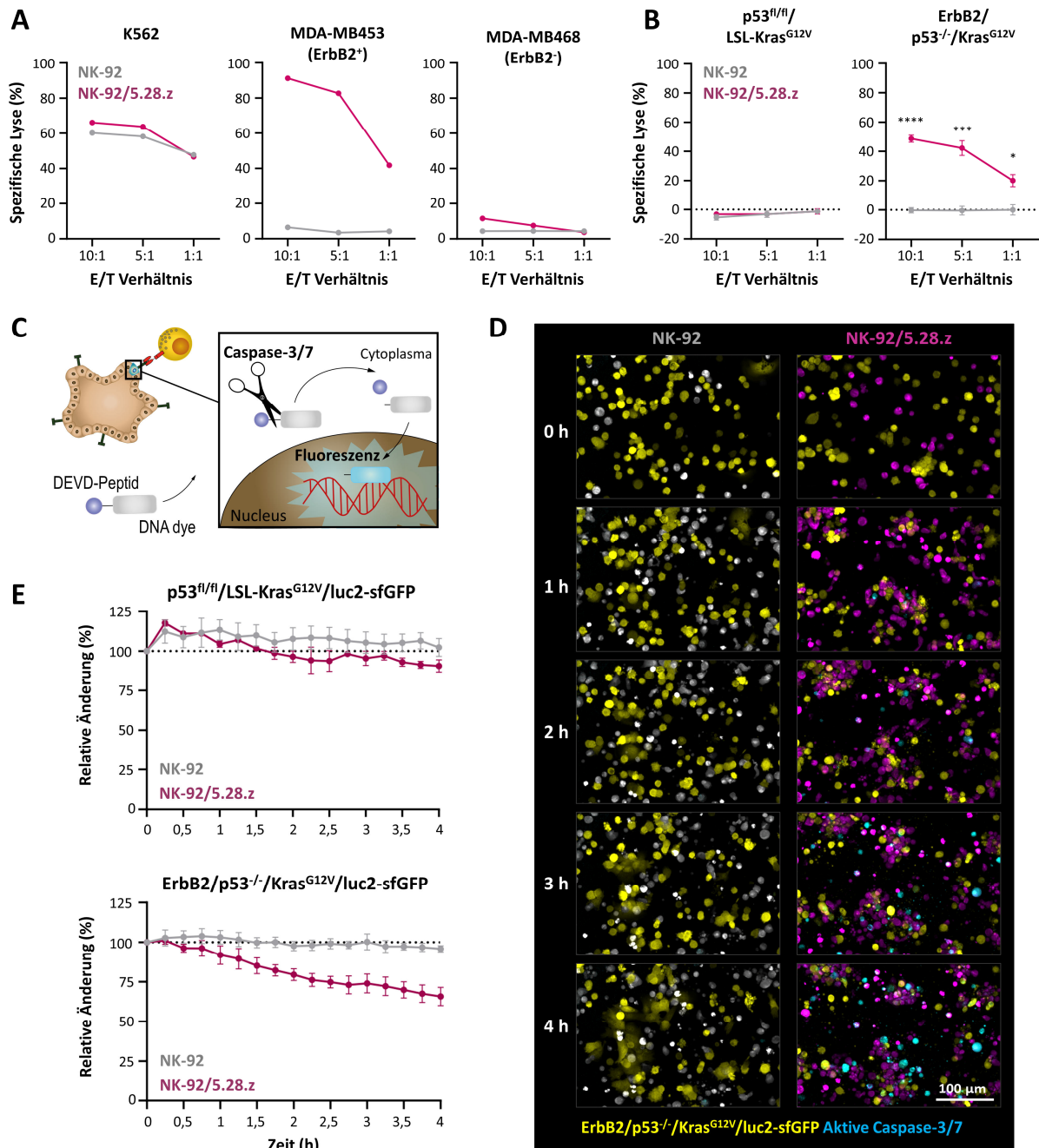
In einer 4-stündigen Ko-Kultur mit dissoziierten p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen fand wie erwartet weder eine Lyse durch NK-92 noch durch NK-92/5.28.z Zellen statt (siehe Abb. 4.16 B). Hingegen wurden ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen durch NK-92/5.28.z bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 durchschnittlich zu  $48,7 \% \pm 2,4 \%$  lysiert. Auch bei einem E/T-Verhältnis von 5:1 und 1:1 wurde mit einer Lyse von  $42,2 \% \pm 5 \%$  und

20,2 %  $\pm$  4,1 % ein signifikanter Unterschied zu parentalen NK-92 Zellen festgestellt, die nicht zu einem Abtöten der Zielzellen führten (< 1 %). Die Lyse durch NK-92/5.28.z Zellen ist somit auf die Expression von ErbB2 durch die Zielzellen zurückzuführen.

Um die dynamischen Prozesse der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität zu untersuchen, wurde ein mikroskopisches Zeitraffer-Experiment etabliert, in welchem dissoziierte Mamma-Epithelzellen in Anwesenheit eines NucView-Caspase-3/7-*Biotrackers* mit NK-Zellen ko-inkubiert wurden. Bei NucView-Caspase-*Biotrackern* handelt es sich um membran-permeable DNA-Farbstoffe, welche mit der Caspase-3/7 Erkennungssequenz (DEVD-Peptid) verknüpft sind und in diesem Zustand keine Fluoreszenz aufweisen. In Zellen mit aktiver Caspase-3/7 wird das DEVD-Peptid geschnitten, sodass ein fluoreszenter Farbstoff entsteht, der in den Zellkern transloziert, an die DNA bindet und somit apoptotische Zellen in Echtzeit markiert (siehe Abb. 4.16 C). Repräsentative Einzelbilder einer Zeitraffer-Analyse veranschaulichen dabei die Kinetik der NK-92/5.28.z-vermittelten Lyse von dissoziierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen. Dafür wurden die Reporter-gen-exprimierenden Zielzellen mit NK-Zellen in einem E/T-Verhältnis von 1:1 ko-inkubiert. Während NK-92 Zellen keine offensichtliche Lyse der Zielzellen vermitteln (siehe Abb. 4.16 D, links), konnte bei NK-92/5.28.z Zellen sowohl eine Reduktion an sfGFP-positiven Zielzellen als auch eine Zunahme der Caspase3/7-positiven Zellen beobachtet werden (siehe Abb. 4.16 D, rechts).

In einer quantitativen Zeitraffer-Analyse wurde die Abnahme des sfGFP-Signals (MFI) alle 15 Minuten ermittelt (siehe Abb. 4.16 E). Dabei wurden bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen über den Zeitraum des Experiments nur geringe Veränderungen detektiert, die zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen aufwiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Lyse von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen bereits nach einer 30-minütigen Inkubation mit CAR-exprimierenden NK-Zellen ein signifikanter Unterschied zu parentalen NK-92 Zellen ( $p = 0,0007$ ). Mit einer Signalreduktion von 35,06 %  $\pm$  6,7 % konnte nach einer 4-stündigen Ko-Kultur eine spezifische Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen durch NK-92/5.28.z nachgewiesen werden ( $p < 0,000001$ ). Wie in der durchflusszytometrischen Analyse wurde damit die selektive Sensitivität der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen gegenüber ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z bestätigt. Das hier etablierte mikroskopische Assay ermöglicht zudem, nachfolgend die Anti-Tumor-Aktivität der CAR-NK-92-Zellen gegen 3D-Kulturen zu bestimmen und lässt darüber hinaus eine kinetische Vitalitätsstudie in Echtzeit zu.





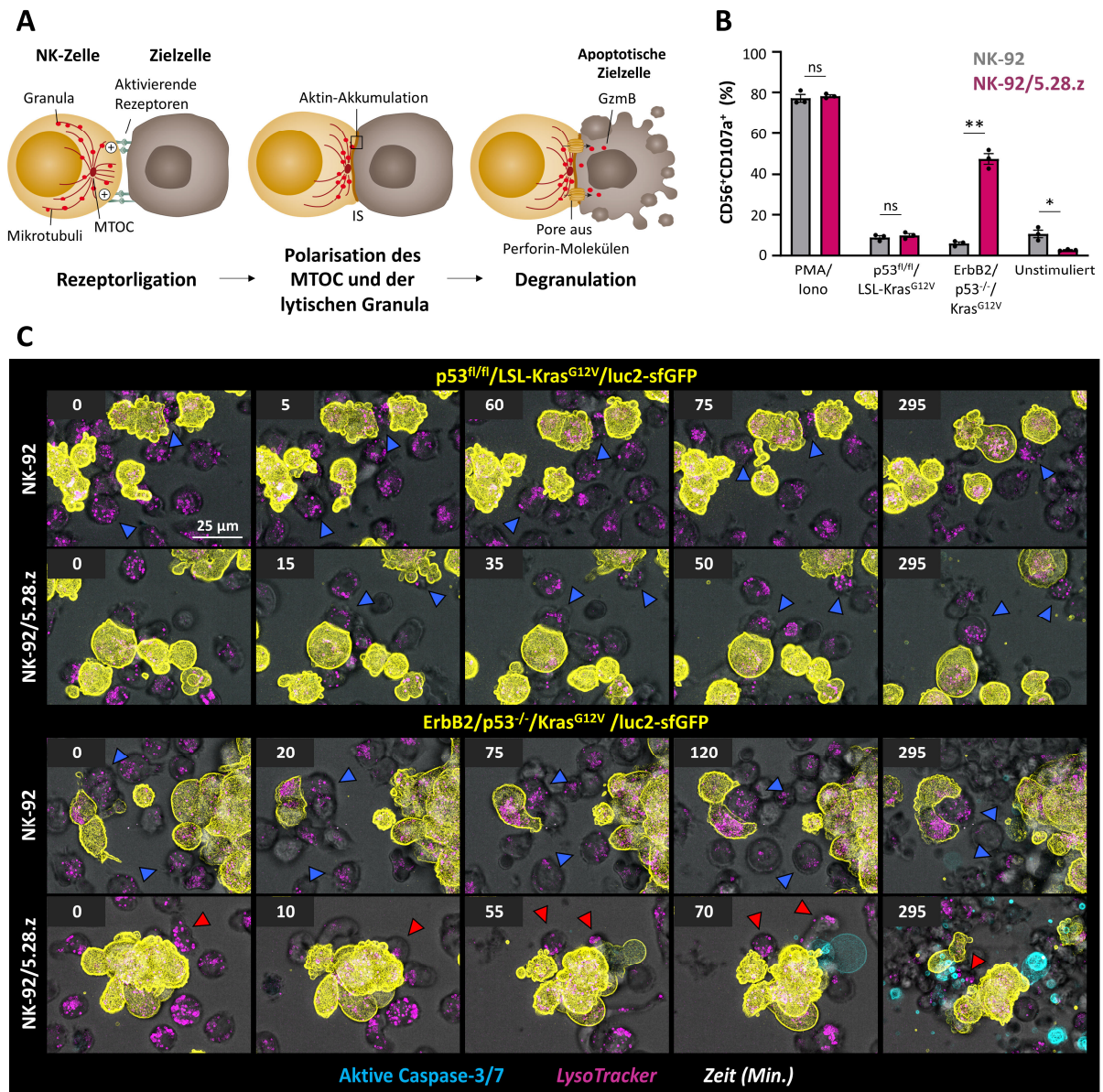
**Abb. 4.16** Natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität von NK-92 Zellen gegen dissoziierte Mamma-Organoiden. **(A)** Zytotoxizität der parentalen und ErbB2-spezifischen NK-92 Zellen (NK-92/5.28.z) gegen ausgewählte Tumorzelllinien. Gezeigt ist eine durchflusszytometrische Analyse, in welcher die natürliche Zytotoxizität der NK-92 Zellen gegen die Tumorzelllinie K562 und die CAR-vermittelte Zytotoxizität gegen die Brustkrebszelllinien MDA-MB453 (ErbB2<sup>+</sup>) und MDA-MB468 (ErbB2<sup>-</sup>) durch eine zweistündigen Ko-Kultur in unterschiedlichen Effektor/Target (E/T)-Verhältnissen ermittelt wurde. **(B)** Zytotoxizität CAR-exprimierender NK-92 Zellen gegen dissoziierte Organoiden. Dissoziierte Organoiden wurden in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen für 4 h mit parentalen NK-92 oder NK-92/5.28.z ko-inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von vier unabhängigen Experimenten. **(C)** Schematische Darstellung der Wirkungsweise des NucViewCaspase-Biotrackers. Der membran-permeable DNA-Farbstoff, dessen Fluoreszenz über die Kopplung des DEVD-Peptids inhibiert wird, kann durch aktive Caspase-3/7 geschnitten werden, in den Zellkern translozieren und durch Bindung an DNA apoptotische Zellen fluoreszent markieren. **(D)** Repräsentative MIPs eines Mikroskopie-basierten Zytotoxizitätsassays von NK-Zellen gegen ErbB2<sup>+</sup>-Mamma-Organoiden (ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>). Dissoziierte luc2-sfGFP-exprimierende Organoiden (gelb) wurden mit parentalen NK-92 (grau) oder CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen (magenta) in einem E/T-Verhältnis von 1:1 ko-kultiviert. Apoptotische Zellen können über die Abnahme des sfGFP-Signals bei gleichzeitiger Zunahme der Caspase-3/7 Aktivität (cyan) beobachtet werden. **(E)** Kinetik der NK-Zell-vermittelten Lyse dissoziierter Mamma-Organoiden. Dissoziierte luc2-sfGFP-exprimierende Organoiden wurden mit parentalen und CAR-exprimierenden NK-92 Zellen in einem E/T-Verhältnis von 1:1 ko-inkubiert. Die Lyse der Zielzellen wurde über den Zeitraum von 4 h in einer Zeitraffer-Analyse untersucht. Dabei

wurde die MFI des sfGFP-Signals zu jedem Zeitpunkt gegen den Zeitpunkt 0 normalisiert und die prozentuale Veränderung bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD der prozentualen Veränderung von vier verschiedenen Feldern eines mikroskopischen Experiments. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$

Neben der direkten Lyse von Zielzellen wurde zudem die Aktivierung der NK-Zellen nach Ko-Kultur mit  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ - und  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen untersucht. Die Aktivität von Effektorzellen kann dabei beispielsweise über die polarisierte Freisetzung zytotoxischer Granula bestimmt werden (siehe Abb. 4.17 A). Mit Hilfe zahlreicher Oberflächenrezeptoren und Adhäsionsmoleküle interagieren NK-Zellen mit korrespondierenden Liganden auf Zielzellen (Rezeptorligation). Überwiegen dabei die aktivierenden Signale, so folgt unter Reorganisation des Zytoskeletts die Ausbildung einer lytischen immunologischen Synapse (IS). Im Kontaktbereich kommt es dabei zu einer Akkumulation von Aktin und innerhalb der NK-Zelle zu einer Anlagerung der zytotoxischen Granula an Mikrotubuli des *Microtubule organizing centers* (MTOC), welches in Richtung der IS polarisiert. Bei der Exozytose der lytischen Granula werden Effektormoleküle wie Granzym B (GzmB) und Perforin freigesetzt, die zu einer Lyse der Zielzelle führen (Orange, 2008). Das Protein CD107a ist in der Membran zytotoxischer Granula vorzufinden und wird nach der Degranulation an die Zelloberfläche der Effektorzelle exponiert. Die Externalisierung kann somit als direkter Nachweis für die Exozytose lytischer Granula dienen und ermöglicht gleichzeitig eine Quantifizierung der aktivierten Zellen (Cohen *et al*, 2013).

In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde ein CD107a-basiertes Degranulationsassay durchgeführt (siehe Abb. 4.17 B). Die maximale Degranulationsfähigkeit der Effektorzellen wurde durch die Stimulation mit PMA und Ionomycin ermittelt und betrug im Durchschnitt  $77,2 \% \pm 1,9 \%$  CD107a-positive Zellen bei parentalen und  $78,2 \% \pm 0,6 \%$  bei CAR-exprimierenden NK-92 Zellen. In Ko-Kulturen mit  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen wurde eine geringe Degranulation der NK-Zellen beobachtet, die keinen signifikanten Unterschied zu unstimulierten Effektorzellen aufwies. Im Gegensatz dazu induzierten  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen eine im Vergleich zu parentalen NK-92 Zellen ( $5,9 \% \pm 0,8 \%$ ) signifikante Steigerung des Anteils CD107a positiver NK-92/5.28.z Zellen ( $47,4 \% \pm 2,6 \%$ ). Dies weist eine ErbB2-spezifische Degranulation nach. Um die dynamischen Prozesse der Kontaktbildung und Degranulation näher zu untersuchen, wurde ein mikroskopisches Zeitraffer-Experiment durchgeführt (siehe Abb. 4.17 C), in welchem NK-Zellen zur Visualisierung der zytotoxischen Granula mit *LysoTracker* gefärbt und anschließend mit Zielzellen ko-inkubiert wurden. In allen Ansätzen konnte dabei eine Kontaktbildung zwischen Effektor- und Zielzellen beobachtet werden. Wenn NK-Zellen mit  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen kultiviert wurden, wurde nach Konjugatbildung eine zufällige Verteilung der Granula festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde eine gerichtete Polarisation der zytotoxischen Granula beobachtet, wenn NK-92/5.28.z mit  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen in Kontakt traten. Die dadurch induzierte Lyse der Zielzellen konnte dabei durch die Aktivierung der Effektorcaspase-3/7 mit Hilfe des NucView-Caspase-*Biotracker* veranschaulicht werden.

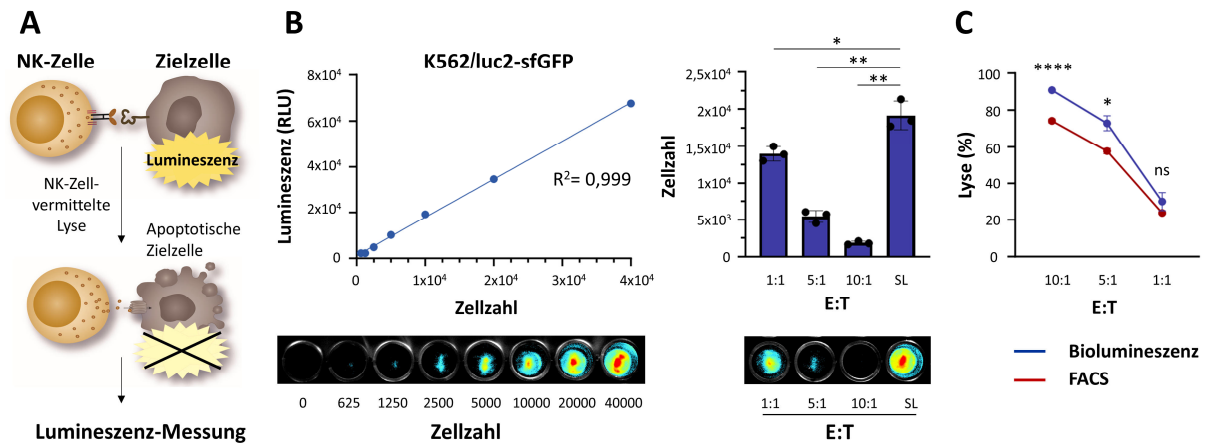




**Abb. 4.17 Degranulation von parentalen und CAR-exprimierenden NK-92 Zellen in Ko-Kulturen mit dissoziierten Mamma-Organoiden.** (A) Schematische Darstellung der Kontaktbildung und Freisetzung zytotoxischer Granula durch NK-Zellen. Nach Rezeptorligation von NK- und Zielzellen und Integration aktivierender Signale kommt es zur Reorganisation des Zytoskeletts. Dies führt zu einer Akkumulation von Aktin innerhalb der Kontaktzone. Die lytische immunologische Synapse (IS) wird ausgebildet, das *Microtubule organizing center* (MTOC) und die zytotoxischen Granula polarisieren zur IS und es kommt zu einer gerichteten Freisetzung der Granula in den synaptischen Spalt (Degranulation). Durch Exozytose von Effektormolekülen, wie Perforin und Granzym (Gzm) B wird die Zielzelle lysiert und die Effektorzelle löst sich. (B) Degranulationsassay mittels durchflusszytometrischer Analyse der CD107a-Oberflächenexposition. NK-Zellen wurden mit Zielzellen in Anwesenheit eines Fluorochrom-gekoppelten CD107a-spezifischen Antikörpers kultiviert, nach 1 h mit Golgi-Stop versetzt und nach weiteren 4 h durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression von CD107a untersucht. Als Positivkontrolle dienten NK-92 Zellen, die mit PMA und Ionomycin versetzt wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM von drei unabhängigen Experimenten. (C) Repräsentative Aufnahmen eines mikroskopischen Degranulationsassays mit *LysoTracker*. Dissoziierte luc2-sfGFP-exprimierende p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen wurden in Fibronektin-beschichtete optische Petrischalen ausgesät und nach Adhärenz mit *LysoTracker*-gefärbten NK-Zellen und NucViewCaspase-Biotracker versetzt. Die mikroskopischen Aufnahmen erfolgten bei 60-facher Vergrößerung in einem Abstand von 5 Minuten über den Zeitraum von 5 h. Dargestellt sind prozessierte Maximumintensitätsprojektionen von optischen Schnittserien. Blaue Pfeile markieren Konjugatbildungen zwischen Ziel- und Effektorzellen, die zu keiner Degranulation führten, während rote Pfeile eine gerichtete Polarisation lytischer Granula und die Lyse der Zielzellen markieren. ns: p ≥ 0,05; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,01.

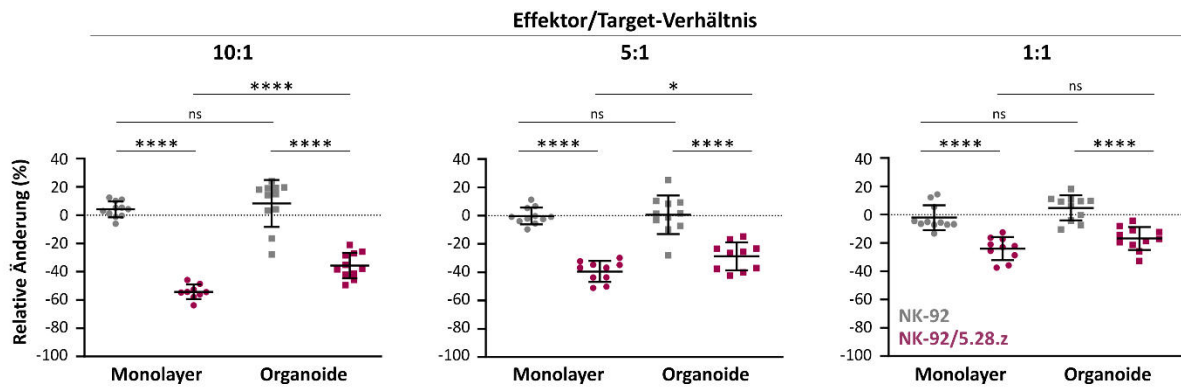
### 4.3.3 CAR-NK-Zell-Aktivität gegen 3D-Kulturen

Um die NK-Zell-vermittelte Lyse gegen 3D-Kulturen zu untersuchen, wurde neben einer mikroskopischen Zeitraffer-Analyse weiterhin ein Biolumineszenz-basiertes Zytotoxizitätsassay etabliert. Mit Hilfe der  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}/luc2-sfGFP$ - und  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}/luc2-sfGFP$ -Zellen, wurde in einem Titrationsexperiment zunächst eine optimale Luciferin-Konzentration von 75  $\mu\text{g/ml}$  ermittelt (Daten nicht gezeigt). Diese Konzentration führte nach 30-minütiger Inkubationszeit zu einem stabilen Lumineszenzsignal, welches auch nach 48 h noch detektiert werden konnte und sich durch eine hohe Sensitivität auch bei geringen Zellzahlen (<2500 Zellen) auszeichnete (Daten nicht gezeigt). Für die Etablierung eines Luciferase-basierten Reporterassays (siehe Abb. 4.18 A) wurden  $luc2$ -exprimierende Zielzellen mit Substrat versetzt und die resultierende Biolumineszenz wurde bestimmt. Die NK-Zell-vermittelte Lyse konnte dann über die Abnahme des Lumineszenzsignals bestimmt werden, da Zielzellen nach Verlust der Membranintegrität Luciferase freisetzen. Freie Luciferase in Zellkulturmedium weist eine geringe Halbwertszeit auf, weshalb die verbleibende Reporteraktivität auf intakte Zielzellen zurückgeführt werden kann. Für die Validierung des Luciferase-basierten Zytotoxizitätsassays wurden K562-Zellen unter Verwendung des  $pS-luc-V5-T2A-sfGFP-W$  (siehe Abb. 4.15 A) transduziert und mittels FACS angereichert (Daten nicht gezeigt). Mit Hilfe einer Zellverdünnungsreihe wurde eine Standardkurve ermittelt (siehe Abb. 4.18 B, links). Das gemessene Lumineszenz-Signal korrelierte dabei proportional mit der Anzahl der Zellen ( $R^2=0,999$ ) und konnte somit zur Quantifizierung absoluter Lebendzellzahlen verwendet werden. Nach einer zweistündigen Ko-Inkubation von K562/ $luc2-sfGFP$ -Zellen mit parental NK-92 Zellen wurde bei allen E/T-Verhältnissen eine Abnahme des Lumineszenz-Signals und somit eine signifikante Reduktion der Zielzellen im Vergleich zur spontanen Lyse (SL) ermittelt (siehe Abb. 4.18 B, rechts). Gegenüber einem durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassay konnten dabei höhere Zelllyseraten verzeichnet werden (siehe Abb. 4.18 C). Die signifikanten Unterschiede der Messungen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 (Biolumineszenz: 90,8 %  $\pm$  1,2 %; FACS: 74,2 %  $\pm$  1,0 %) und 5:1 (Biolumineszenz: 72,9 %  $\pm$  4,0 %; FACS: 57,7 %  $\pm$  1,5 %) deuten auf eine höhere Sensitivität des Luciferase-Reporterassays hin.



**Abb. 4.18** Etablierung eines Luciferase-Reporterassays zur Zytotoxizitätsbestimmung. **(A)** Schematische Darstellung eines Biolumineszenz-basierten Zytotoxizitätsassays. Luciferase-exprimierende Zielzellen weisen ein zur Zellzahl proportionales Lumineszenz-Signal auf. Die Lyse von Zielzellen resultiert in der Abnahme aktiver Luciferase, was über eine Signalreduktion detektiert werden kann. **(B)** Validierung des Biolumineszenz-basierten Zytotoxizitätsassays. Links: K562/luc2-sfGFP-Zellen wurden in einer Verdünnungsreihe ausgesät und mit Luciferin versetzt. Die Anzahl der Zellen ist direkt proportional zum Lumineszenz-Signal ( $R^2 = 0,999$ ). Rechts: NK-92 Zellen wurden für 2 h mit K562/luc2-sfGFP-Zellen in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen ko-kultiviert. Als Kontrolle wurden Zielzellen ohne NK-Zell-Zugabe mitgeführt (spontane Lyse, SL). Die Lumineszenz wurde am SpectraMax iD3 gemessen (oben) und in einer Biolumineszenz-Bildgebung (unten) dokumentiert. **(C)** Vergleich eines Biolumineszenz-basierten und durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassays. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD repräsentativer Zytotoxizitätsassays in dreifacher Ausführung von NK-92 in Ko-Kultur mit K562/luc2-sfGFP-Zielzellen, welche über Biolumineszenz- (blau) oder in einer durchflusszytometrischen Messung (rot) untersucht wurden. ns:  $p \geq 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

Das somit etablierte und funktional validierte Zytotoxizitätsassay wurde nachfolgend für die Analyse von NK-Zell-Organoid-Ko-Kulturen eingesetzt. Zunächst wurde dabei die Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen in 2D- und 3D-Kultur vergleichend untersucht (siehe Abb. 4.19). Dafür wurden intakte und dissoziierte Organoide auf Fibronectin-beschichteten Platten ausgesät. Die Zellzahl der unterschiedlichen Wells wurde mit Hilfe einer Standardkurve aus dissoziierter Luciferase-exprimierenden Zielzellen ermittelt. Anschließend wurden NK-Zellen in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen für 4 h ko-kultiviert. Während in Ansätzen mit parentalen NK-92 Zellen nur marginale Veränderungen relativ zum Versuchsbeginn ermittelt wurden, konnte eine spezifische ErbB2-gerichtete Lyse durch NK-92/5.28.z Zellen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich Unterschiede in der Lyseaktivität von NK-92/5.28.z Zellen gegen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen in 3D-Kultur. Bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 betrug der Anteil abgetöteter Zellen in 2D-Kulturen durchschnittlich 54,3 %  $\pm$  5,2 %, während die Lyse von Organoiden lediglich 35,7 %  $\pm$  9,0 % betrug. Ein signifikanter Unterschied konnte auch bei einem E/T-Verhältnis von 5:1 verzeichnet werden, bei dem 2D-Kulturen durchschnittlich zu 39,5 %  $\pm$  7,3 % und 3D-Kulturen zu 28,8 %  $\pm$  9,8 % durch NK-92/5.28.z Zellen lysiert wurden. Diese Daten zeigen, dass ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen in 3D-Kultur insgesamt weniger effektiv abgetötet wurden, was auf die höhere Komplexität der Organoid-Kulturen zurückgeführt werden könnte.



**Abb. 4.19 Biolumineszenz-basierte Zytotoxizitätsassays mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und 2D- oder 3D-Kulturen.** ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Organoiden wurden dissoziiert oder als intakte 3D-Kulturen in 96-Well-Platten ausgesät. Dissoziierte Zellen wurden zudem für eine Zellverdünnungsreihe verwendet und dienten als Standard zur Ermittlung der Zellzahl in Wells mit intakten Organoiden. Die Zellen wurden in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen mit parentalen (grau) oder ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zellen (magenta) versetzt. Nach einer 4-stündigen Ko-Kultur wurde die Biolumineszenz bestimmt und das gemessene Signal gegen den Anfangswert normalisiert. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert  $\pm$  SD aller Messungen aus drei unabhängigen Experimenten. ns:  $p \geq 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*:  $p < 0,0001$ .

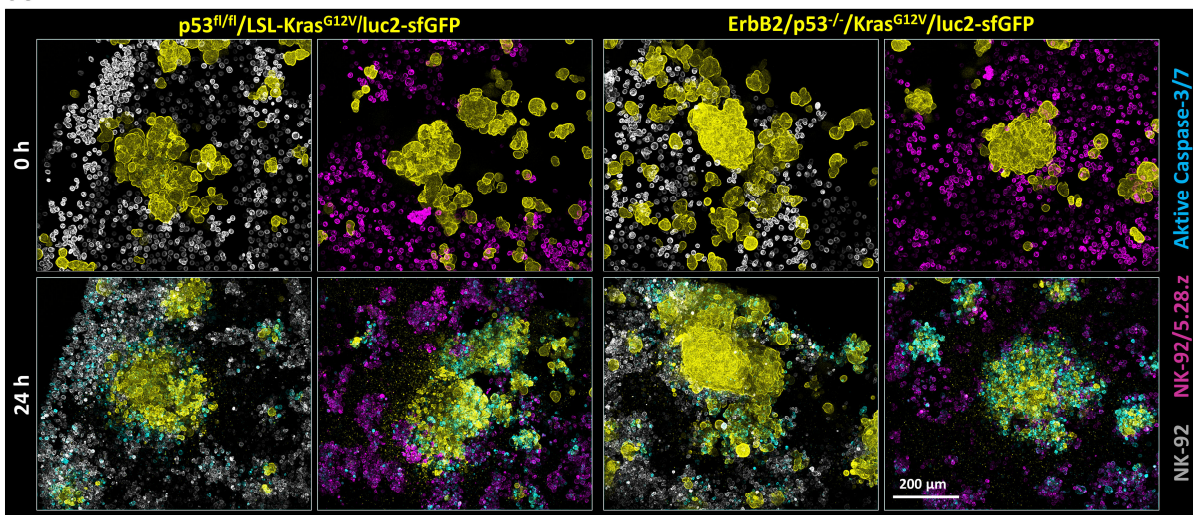
Nachfolgend wurde die NK-Zell-Aktivität gegen Organoiden in mikroskopischen Langzeit-Assays untersucht. Dafür wurden p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Organoiden mit  $2 \times 10^5$  parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen ko-kultiviert. In ausgewählten Aufnahmen eines Zeitraffer-Experiments wurde die Lyse der Organoiden durch die Abnahme des Reportergens sfGFP und die Zunahme des NucView-Biotracker-Signals veranschaulicht (siehe Abb. 4. 20 A). Dabei waren zu Beginn des Experiments (Zeitpunkt 0 h) intakte Organoiden ohne Caspase-3/7-Aktivität und zufällig verteilte NK-Zellen zu beobachten. Nach 24-stündiger Ko-Inkubation waren hingegen alle Organoiden von NK-Zellen umgeben. Weiterhin fiel auf, dass unabhängig von der eingesetzten NK-Zelllinie sowohl in ErbB2<sup>-</sup>- als auch in ErbB2<sup>+</sup>-Organoiden Aktivität von Caspase-3/7 nachgewiesen werden konnte. Um diese Beobachtungen zu bestätigen, wurde ein Langzeit-Luciferase-Reporterassay durchgeführt, in welchem 3D-Kulturen in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen mit NK-Zellen kultiviert wurden. Nach 24 h wurde die relative Änderung bestimmt (siehe Abb. 4. 20 B). Auch hier konnte eine ErbB2-unabhängige Lyse von Organoiden festgestellt werden. So wurden p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen nach Ko-Inkubation mit parentalen und CAR-exprimierenden NK-Zellen gleichermaßen lysiert. Bei unterschiedlichen E/T-Verhältnissen konnte dabei eine Signalreduktion von 77,9 – 90,9 % festgestellt werden. Ein Antigen-unabhängiges Abtöten wurde auch bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Organoiden beobachtet, welche durch parentale NK-92 Zellen bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 zu  $69,9 \% \pm 14,4 \%$  lysiert wurden. Zwar war die Lyse mit NK-92/5.28.z Zellen geringfügig höher ( $86,9 \% \pm 4,14 \%$ ), allerdings wurde ein signifikanter Unterschied nur bei einem E/T-Verhältnis von 1:1 (NK-92:  $43,5 \% \pm 6,1 \%$  und NK-92/5.28.z:  $67,0 \% \pm 5,7 \%$ ) festgestellt.

Um die ErbB2-unabhängige Aktivierung der NK-Zellen weiter zu untersuchen, wurde ein Langzeit-Degranulationsassay mit dissoziierten Organoiden über einen Zeitraum von 24 h durchgeführt (siehe

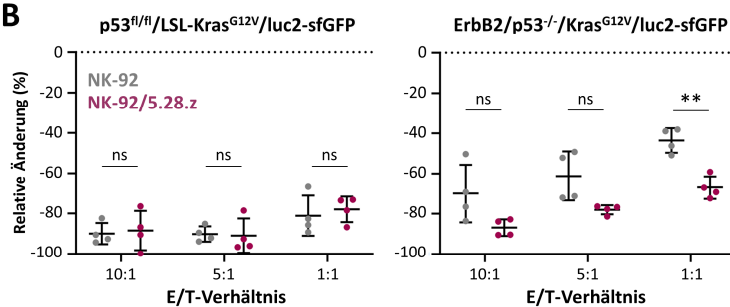


Abb. 4. 20 C). Im Vergleich zu einer 4-stündigen Ko-Kultur (Abb. 4.17, B: NK-92: 6,6 % ± 2,2 %; NK-92/5.28.z: 2,7 % ± 0,4 %), zeigten NK-92 Zellen nach 24 h bereits ohne Zielzellen eine erhöhte Oberflächenexposition des Membranproteins CD107a (NK-92: 14,3 % ± 6,5 %; NK-92/5.28.z: 18,4 % ± 3,7 %). Dies deutet auf eine gesteigerte basale Degranulation hin. Zwischen Effektorzellen ohne Zielzell-Zugabe und einer Ko-Kultur mit p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen, konnte kein signifikanter Unterschied im Anteil CD107a-positiver NK-Zellen festgestellt werden, sodass sich die beobachtete Lyse dieser Zielzellen (siehe Abb. 20 A und B) nicht auf eine spezifische Degranulation zurückführen lässt. Ein zur unstimulierten Kontrolle vergleichbarer Anteil CD107a-positiver Effektorzellen wurde auch bei parentalen NK-92 Zellen in Ko-Kultur mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu induzierte die Ko-Kultur von ErbB2<sup>+</sup>-Zielzellen mit NK-92/5.28.z, eine deutlich gesteigerte CD107a-Oberflächenexposition von 41, 8 % ± 4,7 % mit einem signifikanten Unterschied zu unstimulierten Effektorzellen, parentalen NK-92 Zellen in Ko-Kultur mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen sowie NK-92/5.28.z, die mit p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ko-inkubiert wurden.

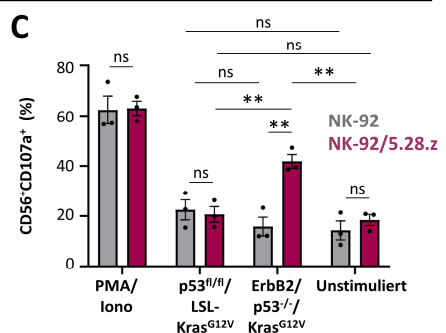
**A**



**B**



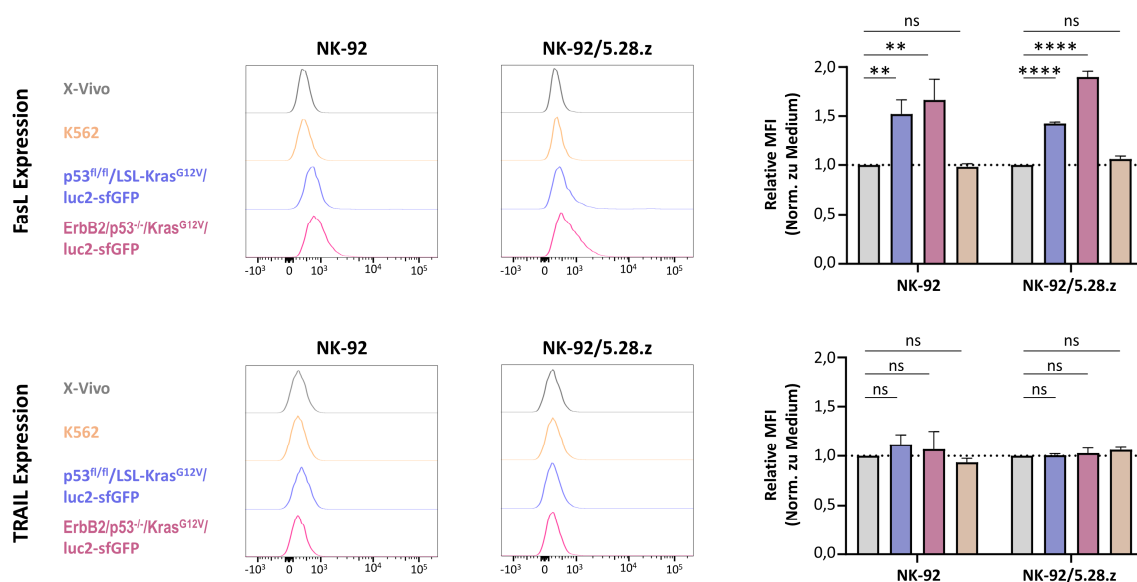
**C**



**Abb. 4.20 Langzeit-Ko-Kulturen zur Analyse der von parentalen und CAR-exprimierenden NK-92 Zellen-vermittelten Zytotoxizität gegen Mamma-Organoiden. (A)** Zeitraffer-Mikroskopie eines 24-stündigen Zytotoxizitätsassays. Gezeigt sind ausgewählte Maximumintensitätsprojektionen zum Zeitpunkt 0 h und 24 h einer Ko-Kultur von parentalen (grau) oder CAR-exprimierenden NK-92 (magenta) und luc2-sfGFP-exprimierenden Mamma-Organoiden (gelb) in Gegenwart des Caspase-3/7-Biotrackers (cyan). **(B)** Biolumineszenz-basiertes Langzeit-Zytotoxizitätsassay. Mamma-Organoiden wurden in eine 96-Well-Platte ausgesät und in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen mit parentalen (grau) oder ErbB2-spezifischen CAR-NK Zellen (magenta) versetzt. Nach einer 24-stündigen Ko-Kultur wurde die Biolumineszenz bestimmt und das gemessene Signal gegen den Anfangswert normalisiert. Dargestellt sind der Mittelwert ± SD und die Einzelmessungen eines repräsentativen

Zytotoxizitätsassays. (C) Degranulationsassay mittels durchflusszytometrischer Analyse der CD107a-Oberflächenexposition. NK-Zellen wurden mit luc2-sfGFP-exprimierenden Zielzellen in Anwesenheit eines Fluorochrom-gekoppelten Antikörpers mit Spezifität für CD107a ko-kultiviert, nach 1 h mit Golgi-Stop versetzt und nach einer weiteren Inkubation von 24 h durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression von CD107a untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten. ns:  $p \geq 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ .

Da die ErbB2-unabhängige Lyse in den dargestellten Experimenten nicht auf eine spezifische NK-Zell-Rezeptor-vermittelte Exozytose lytischer Granula zurückzuführen war, könnte auch ein alternativer Mechanismus der NK-92 Zellen zu einer kontaktabhängigen Abtötung von Zielzellen beitragen. So exprimieren NK-Zellen spezifische Todesliganden, welche die Caspase-abhängige Apoptose induzieren können (Zamai *et al*, 1998b). Zwei Vertreter solcher Todesliganden stellen *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) und Fas-Ligand (FasL) dar. Um zu untersuchen, ob die Interaktion mit Zielzellen in einer gesteigerten Oberflächenexpression der Liganden resultiert, wurden NK-Zellen mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ko-kultiviert und nach 24 h durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrolle dienten K562-Zellen, welche kein Fas exprimieren und eine Resistenz gegen TRAIL-vermittelte Apoptose aufweisen (Kim *et al*, 2000, 2009). In repräsentativen Histogrammen wurde tatsächlich eine veränderte Häufigkeitsverteilung des FasL-Signals beobachtet, wenn parentale und CAR-exprimierende NK-92 Zellen mit den murinen Mamma-Epithelzellen ko-kultiviert wurden (siehe Abb. 4. 21, oben links). Dabei wurde eine signifikante Erhöhung der relativen MFI gegenüber Effektorzellen ohne Zielzellen festgestellt. Im Gegensatz dazu konnten keine Unterschiede beobachtet werden, wenn NK-Zellen mit K562 kultiviert wurden. Die Expression von TRAIL zeigte keine Veränderung nach Ko-Kultur mit Mamma-Epithelzellen oder K562 (siehe Abb. 4. 21, unten).



**Abb. 4.21 Expression der Todesliganden TRAIL und FasL auf NK-92 Zellen nach Stimulation mit Zielzellen.** Parentale und CAR-exprimierende NK-92 Zellen wurden für 24 h mit Medium, K562 (Fas<sup>+</sup>, TRAIL-resistent) oder dissoziierten luc2-sfGFP exprimierenden Organoiden ko-kultiviert und anschließend mit Fluorochrom-gekoppelten FasL- oder TRAIL-spezifischen Antikörpern gefärbt. Gezeigt sind Repräsentative Häufigkeitsverteilungen der durchflusszytometrischen Analyse von FasL (oben) und TRAIL (unten) auf NK-92 und NK-92/5.28.z Zellen sowie relative MFIs nach Normalisierung gegen die Medium-Kontrolle (Mittelwerte  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments). ns:  $p \geq 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,0001$ .

Die gesteigerte Expression von FasL auf den NK-Zellen deutet auf eine Todesrezeptor-vermittelte Apoptose der Zielzellen hin und könnte zur ErbB2-unspezifische Lyse von Zielzellen beitragen.

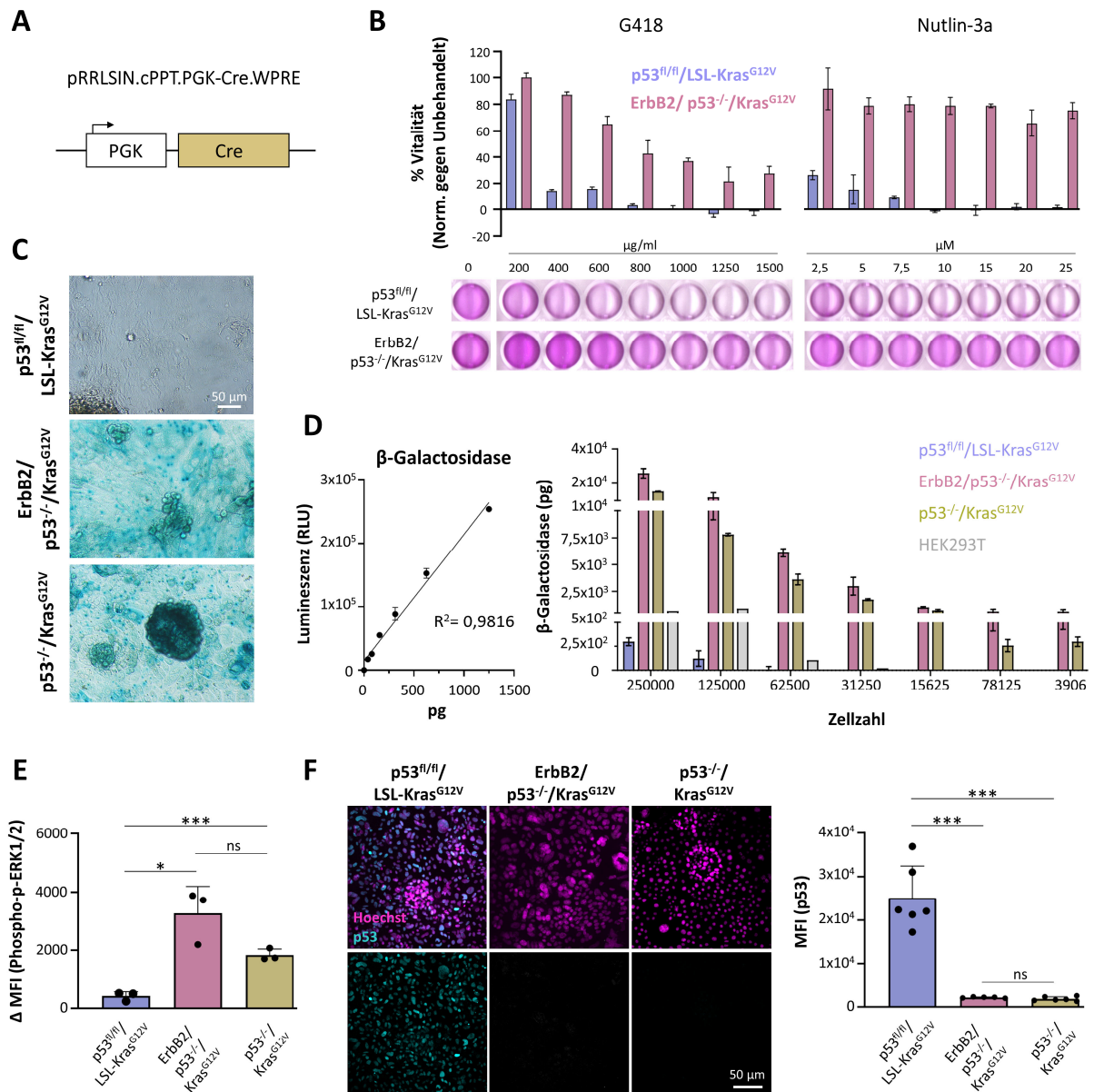
In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}/luc2$ -Zellen in Langzeit-Ko-Kulturen eine höhere Sensitivität gegenüber der natürlichen Zytotoxizität von NK-Zellen aufweisen als die daraus abgeleiteten ErbB2-Cre-modifizierten Organoide (siehe Abb. 4.20 A und B). ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Organoide tragen genetische Treibermutationen, die morphologische und molekulare Veränderungen induzieren (siehe Abschnitt 4.2.4). Dies könnte eine gesteigerte Resistenz gegen NK-92-vermittelte Zytotoxizitätsmechanismen verleihen. Um dies unabhängig von ErbB2 zu prüfen, wurden Organoide generiert, welche zwar die gleichen neoplastischen Mutationen aufweisen, allerdings kein ErbB2 als Zielstruktur exprimieren. Unter Verwendung des Transferplasmids pRRSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE (siehe Abb. 4.22 A) wurden  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen lentiviral transduziert. Da Zellen des CKP-Modells nach der Cre-vermittelten Rekombination das Fusionsprotein  $\beta$ -Geo exprimieren, wurde eine Selektion mit dem Antibiotikum G418 getestet. Weiterhin wurde untersucht, ob  $p53$ -defiziente Zellen mit Hilfe des MDM2-Inhibitors Nutlin-3a angereichert werden können. In einer *Killing Curve* wurde zunächst der Einfluss von G418 und Nutlin-3a auf die Vitalität der  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ - und ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen untersucht (siehe Abb. 4. 22 B). Nach einer zweiwöchigen Selektion wurde mit einer Kristallviolett-Färbung der Anteil der lebenden Zellen bestimmt (siehe Abb. 4. 22 B, unten). Dabei konnte eine Sensitivität der  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen gegenüber beiden Substanzen nachgewiesen und die Zusammensetzung des Selektionsmediums (600  $\mu$ g/ml G418 + 10  $\mu$ M Nutlin-3a) bestimmt werden, welche zwar zu einem Absterben der  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen führte, aber von ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Organoiden größtenteils toleriert wurde. Das Selektionsmedium wurde nachfolgend für die Anreicherung von Cre-modifizierten  $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Organoiden verwendet.

Für einen indirekten Nachweis der Cre-vermittelten Rekombination wurden selektionierte  $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen in 2D-Kultur mittels X-Gal-Färbung auf die Expression von  $\beta$ -Geo untersucht und zeigten dabei wie ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen einen spezifischen blauen Niederschlag (siehe Abb. 4. 22 C). Um die Expressionsniveaus der modifizierten Zellen zu vergleichen, wurde in einem kolorimetrischen Test mit Hilfe des *Galacto-Light Plus<sup>TM</sup>  $\beta$ -Galactosidase Reporter Gene Assays* die Konzentration von  $\beta$ -Geo bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte dabei mit Hilfe eines Standards von rekombinanter  $\beta$ -Galaktosidase (siehe Abb. 4. 22 D, links). Als Kontrollen dienten  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ - und HEK293T-Zellen. In einer seriellen Verdünnungsreihe konnte für  $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ - und ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen jeweils eine zur Zellzahl proportionale Konzentration an  $\beta$ -Geo ermittelt werden ( $R^2(p53^{-/-}/Kras^{G12V}) = 0,95$ ;  $R^2(\text{ErbB2}/p53^{-/-}/Kras^{G12V}) = 0,93$ ). Zwar wurde bei höheren Zellzahlen (62500, 125000, 250000) auch ein unspezifisches Hintergrundsignal in HEK293T- und  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen detektiert, allerdings war dieses um ein Vielfaches geringer als bei korrespondierenden Proben der

modifizierten Zellen des CKP-Modells. Im Vergleich zu hErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen wurde bei p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen im linearen Messbereich eine durchschnittliche Reduktion der  $\beta$ -Geo Konzentration von 35-40 % ermittelt, was auf eine geringere Reporter-gen-Expression hinweist.

Da die Expression von  $\beta$ -Geo an Kras<sup>G12V</sup> gekoppelt ist, wurde nachfolgend die Kras-abhängige Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs untersucht (siehe Abb. 4. 22 E). Dafür wurde eine intrazelluläre Antikörperfärbung gegen phosphoryliertes p-ERK1/2 durchgeführt und die ermittelte MFI gegen die Sekundärantikörper-Kontrolle normalisiert ( $\Delta$  MFI). Die so ermittelten  $\Delta$  MFIs modifizierter Organoide zeigten ein signifikant erhöhtes Signal gegenüber unmodifizierten Zellen. Dabei wurde in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen im Vergleich zu p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ein höheres Phospho-p-ERK1/2-Signal beobachtet. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant ( $p=0,093$ ). Um auszuschließen, dass die geringere  $\beta$ -Geo-Konzentration und die verringerte Aktivität des MAP-Kinase-Signalweg in p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen auf eine unvollständige Selektion zurückzuführen ist, wurden die Zellen zusätzlich auf die Expression von p53 untersucht. Dafür wurden 2D-Kulturen von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-, p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden angelegt, welche einer Immunfluoreszenzfärbung gegen p53 unterzogen und mit Hoechst gegengefärbt wurden (siehe Abb. 4. 22). In repräsentativen mikroskopischen Aufnahmen konnte p53 lediglich in unmodifizierten p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen beobachtet werden. Eine Quantifizierung des Färbesignals (siehe Anhang 4) ergab dabei, dass die MFI von p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- ( $1,8 \times 10^3$ ) sowie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ( $2,1 \times 10^3$ ) gegenüber p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ( $2,5 \times 10^4$ ) signifikant reduziert war. Da in den modifizierten Linien vergleichbare MFIs detektiert wurden, ist davon auszugehen, dass es sich bei p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen um einen vollständig modifizierten Zellpool handelt. Zudem konnten, wie zuvor bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen beobachtet, morphologische Unterschiede wie beispielsweise vergrößerte Zellkerne und eine gesteigerte Organoid-Fläche festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



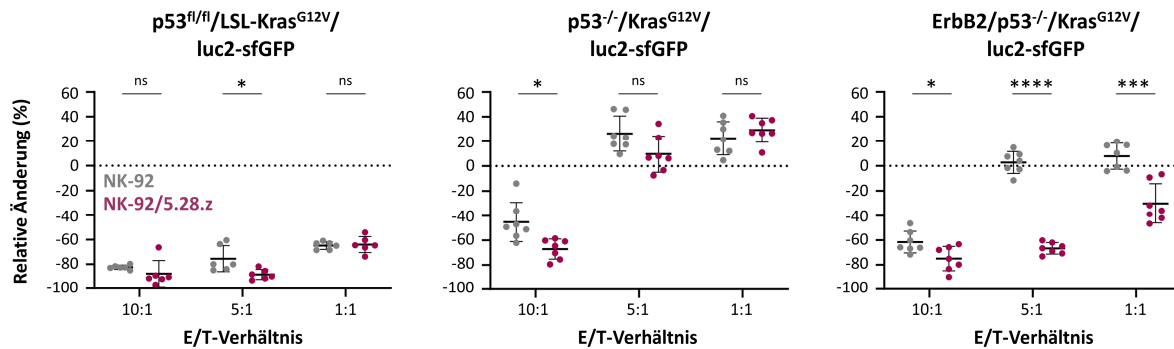


**Abb. 4.22 Generierung und Charakterisierung von  $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Mamma-Organoiden.** (A) Schematische Darstellung des Vektors pRRLSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE. (B) Killing Curve zur Bestimmung der Selektionsdosis von G418 und Nutlin-3a. Unmodifizierte ( $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ ) und modifizierte (ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ ) Organoiden wurden dissoziiert und als 2D-Kultur für 2 Wochen mit G418 oder Nutlin-3a selektioniert. Die Vitalität wurde über ein Kristallviolett-Assay ermittelt. (C) X-Gal-Färbung als Nachweis der  $\beta$ -Geo-Expression. Organoiden wurden mit dem Vektor pRRLSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE genetisch modifiziert, für 2 Wochen mit Nutlin-3a und G418 selektioniert und anschließend in 2D-Kultur einer X-Gal-Färbung unterzogen. Als Kontrolle dienten  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ - und ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Mamma-Epithelzellen. (D) Quantifizierung der  $\beta$ -Galaktosidase. Mit Hilfe des GalactoLight Reporter Gene Assays wurde die  $\beta$ -Geo-Expression von unmodifizierten ( $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ ) und modifizierten Organoiden ( $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$  und ErbB2/ $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ ) untersucht. HEK293T-Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe eines  $\beta$ -Galaktosidase-Standards aus rekombinantem Protein (links). Die Quantifizierung der  $\beta$ -Geo-Konzentration erfolgte in einer seriellen Zellzahlverdünnungsreihe. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines technischen Triplikats. (E) Durchflusszytometrische Analyse von phosphorylierten ERK1/2-Proteinen. Organoiden wurden vereinzelt, fixiert, permeabilisiert und anschließend Antikörperfärbungen gegen Phospho-ERK1/2 in Kombination mit Spezies-spezifischem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern unterzogen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD von drei unabhängigen Experimenten. (F) Mikroskopische Analyse von p53 in unmodifizierten und modifizierten Mamma-Organoiden. Organoiden wurden dissoziiert und als 2D-Kultur in Kammerobjektträgern kultiviert, bevor sie fixiert und in einer Immunfluoreszenzfärbung gegen p53 (cyan) markiert und mit Hoechst (magenta) gegengefärbt wurden. Die Aufnahme mikroskopischer Schnittserien erfolgten bei 20-facher Vergrößerung und sind als Maximumintensitätsprojektion (MIP) dargestellt (links). Die MFI der p53-Färbung wurde mit Hilfe von ImageJ ermittelt. Dafür wurde die Hoechst-Färbung prozessiert, segmentiert und als Maske für die Quantifizierung

des p53-Signals verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der Signale in Zellkernen aus mindestens fünf unabhängigen mikroskopischen Aufnahmen. ns:  $p \geq 0,05$ ; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$

Nachfolgend wurden die zusätzlich generierten p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen als neue Kontrollgruppe zur Ermittlung der NK-Zell-vermittelten Lyse von Mamma-Organoiden eingesetzt. Da in den vorangegangenen Experimenten mit Langzeit-Ko-Kulturen von 24 h die natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen überwog, wurde die Dauer des Experiments nun auf 12 h reduziert, um die Analyse der CAR-vermittelten Lyse von ErbB2<sup>+</sup>-Zielzellen zu ermöglichen. Zunächst wurden p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden zur Expression der Reportergene luc2 und sfGFP lentiviral transduziert (lentivirales Transferplasmid, siehe Abb. 4.15). Modifizierte Zellen wurden dann durchflusszytometrisch angereichert und die Expression und Funktionalität der Reportergene bestätigt (Daten nicht gezeigt). In einem Luciferase-Reporterassay wurden anschließend Ko-Kulturen von parentalen oder CAR-exprimierenden NK-Zellen mit Luciferase-exprimierenden p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-, p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- oder ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden untersucht (siehe Abb. 4.23). Dabei wurde wie zuvor eine starke ErbB2-unabhängige Lyse der p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen beobachtet, die in Abhängigkeit vom E/T-Verhältnis und der eingesetzten NK-Zelllinie zu einer relativen Abnahme des Lumineszenz-Signals um 64 bis 88 % führte. Messbare natürliche Zytotoxizität der NK-Zellen wurde bei einem hohen E/T-Verhältnis von 10:1 auch in Ko-Kulturen mit p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden beobachtet. Bei geringeren E/T-Verhältnissen wurde hingegen in Ko-Kulturen von p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden mit parentalen oder mit CAR-exprimierenden NK-92 Zellen keine Abnahme des Lumineszenz-Signals beobachtet. Ebenso wurde über den Zeitraum des Experiments keine Abnahme des Lumineszenz-Signals festgestellt, wenn ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden mit parentalen NK-92 Zellen in einem E/T-Verhältnis von 5:1 (relative Änderung: 26,3 %  $\pm$  14,3 %) und 1:1 (relative Änderung: 9,6 %  $\pm$  14,6 %) ko-kultiviert wurden. Im Gegensatz dazu wurde bei der Ko-Inkubation von NK-92/5.28.z Zellen mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden eine Signalreduktion um 66,7 %  $\pm$  4,7 % (5:1) bzw. 30,2 %  $\pm$  15,9 % (1:1) beobachtet. Der Unterschied zu parentalen NK-92 Zellen in Ko-Kultur mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden und NK-92/5.28.z Zellen in Ko-Kultur mit p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden war dabei statistisch signifikant ( $p > 0,0001$ ).

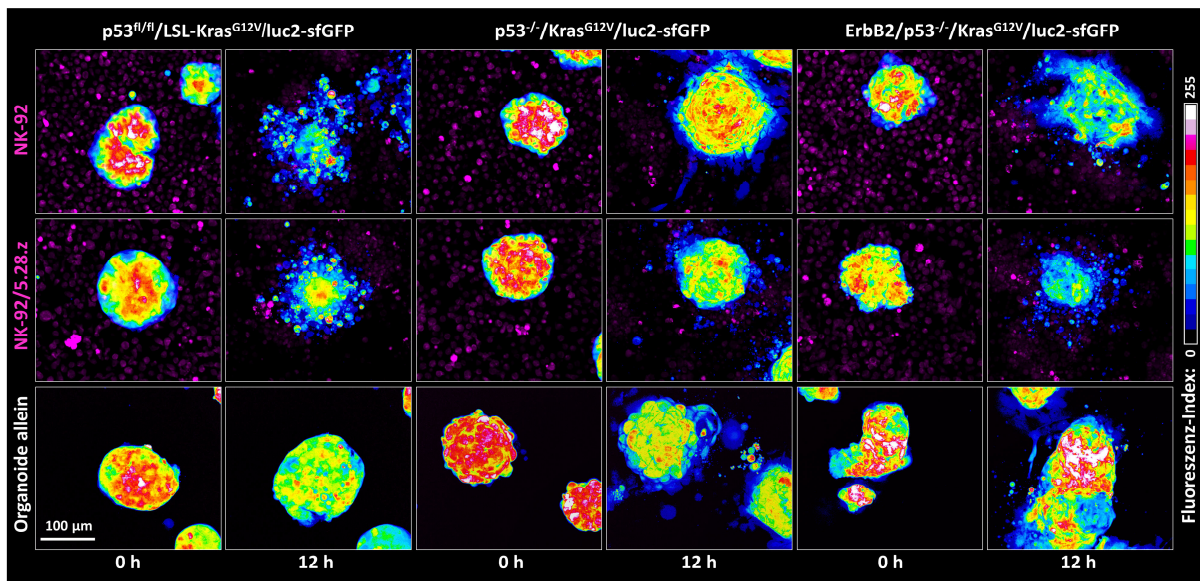
Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die ErbB2-unabhängige Lyse von Cre-modifizierten Organoiden vor allem bei einem hohen Überschuss an Effektorzellen und verlängerten Ko-Inkubationszeiten wie 24 h (vgl. Abb. 4.20 B) auftrat. Bei niedrigeren E/T-Verhältnissen und einer reduzierten Ko-Kultivierungsdauer konnte hingegen eine CAR-vermittelte, ErbB2-spezifische Lyse von Mamma-Organoiden eindeutig nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die zusätzlich generierten p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden eine gut geeignete Kontrolle für die Untersuchung der ErbB2-spezifischen Lyse von Zielzellen darstellen, während sich p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden insbesondere für die Detektion der natürlichen Zytotoxizität eignen.



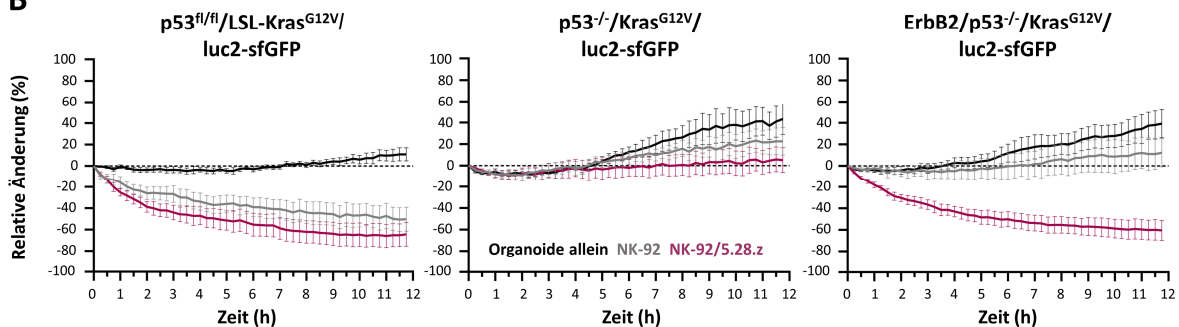
**Abb. 4.23 Biolumineszenz-basiertes Zytotoxizitätsassay mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und Mamma-Organoiden.** p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-, p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Organotide wurden in 96-Well-Platten ausgesät. Eine Verdünnungsreihe dissoziierter Zellen diente als Standard. Nach Ermittlung der Zellzahl in Vertiefungen mit Organoiden wurden parentale oder CAR-exprimierende NK-Zellen in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen ko-kultiviert. Nach einer 12-stündigen Ko-Kultur wurde die Biolumineszenz bestimmt und das gemessene Signal gegen den Anfangswert normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments (n=7). ns: p  $\geq$  0,05; \*: p < 0,05; \*\*: p < 0,001; \*\*\*: p < 0,0001.

Um die Ergebnisse des Luciferase-Reporterassays unabhängig zu bestätigen und gleichzeitig einen Einblick in die dynamischen Prozesse der NK-Zell-vermittelten Lyse von Organoiden zu gewinnen, wurden mikroskopische Zeitraffer-Experimente durchgeführt. In repräsentativen Aufnahmen (siehe Abb. 4.24 A) sind p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-, p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organotide in Ko-Kultur mit NK-92, NK-92/5.28.z oder ohne NK-Zell-Zugabe zum Zeitpunkt 0 h und nach 12 h gezeigt. Um Unterschiede in der Zelldichte zu veranschaulichen, wurde das sfGFP-Signal der Organotide in einer 16-Color-LUT dargestellt, durch welche ein abnehmendes Fluoreszenzsignal über einen Farbgradienten von weiß zu blau kodiert wird. Die Lyse von Organoiden in NK-Zell-Ko-Kulturen wurde dabei sowohl über eine Abnahme des Fluoreszenzsignals als auch durch eine veränderte Organoid-Architektur deutlich. Vor allem die äußeren, den Organoid begrenzenden Zellen wurden lysiert und verloren ihre Integrität. Dies wurde verstärkt bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden in Ko-Kultur mit parentalen und CAR-exprimierenden NK-Zellen beobachtet. Zudem konnte eine gesteigerte Lyse von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden festgestellt werden, wenn diese mit NK-92/5.28.z Zellen ko-inkubiert wurden. Da solche Effekte in Gegenwart von parentalen NK-92 Zellen nur geringfügig auftraten, deutet dies auf eine spezifische CAR-vermittelte Lyse von ErbB2-exprimierenden Organoiden hin. In allen Ansätzen ohne NK-Zellen war hingegen eine Signalverstärkung und/oder Flächenvergrößerung der Organotide über die Zeit zu beobachten. Für eine quantitative Analyse wurde die relative Signalveränderung zu jedem Zeitpunkt des Experiments für individuelle Organotide bestimmt, sodass die durchschnittliche Lyse von Organoiden über eine Abnahme und die Expansion der Zellen über eine Zunahme von sfGFP ermittelt werden konnte (siehe Abb. 4.24 B).

A



B



**Abb. 4.24** Mikroskopie-basiertes Zytotoxizitätsassay mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und luc2-sfGFP-exprimierenden Mamma-Organoiden. Organoide wurden als intakte 3D-Kultur in 96-Well-Platten ausgesät und mit  $2 \times 10^5$  parentalen NK-92, ErbB2-spezifischen CAR-NK-92 oder ohne die Zugabe von Effektorzellen für 12 h in einem Zeitraffer-Experiment analysiert. **(A)** Repräsentative Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) des Mikroskopie-basierten Zytotoxizitätsassays mit NK-Zellen und luc2-sfGFP-positiven Organoiden. Gezeigt sind Zeitpunkt 0 h und 12 h eines Zeitraffer-Experiments von Organoiden (*16-Color-LUT*) in Ko-Kultur mit parentalen NK-92 Zellen (oben), CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z Zellen (Mitte) oder ohne die Zugabe von Effektorzellen (unten). **(B)** Kinetik der NK-92- und NK-92/5.28.z-vermittelten Lyse von Mamma-Organoiden. Mit Hilfe der Software ImageJ wurden MIP-basierte *Hyperstacks* generiert, die MFI des sfGFP-Signals bestimmt und diese anschließend gegen den Anfangswert normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der prozentualen Veränderung von fünf unabhängigen Experimenten, in welchen jeweils 3-8 Organoide pro Ansatz analysiert wurden.

Mit den erhobenen Daten wurde für ausgewählte Zeitpunkte die statistische Signifikanz der ermittelten Unterschiede bestimmt (siehe Tab. 4.1). Im Vergleich zu Organoiden ohne NK-Zell-Zugabe zeigte die Ko-Kultur mit NK-Zellen eine erhöhte Lyse von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden. Dies führte bereits nach 2 h zu signifikanten Unterschieden, die mit fortschreitender Inkubationszeit deutlicher wurden. Unterschiede in der Lyseaktivität der beiden NK-Zelllinien wurden hingegen nicht beobachtet. Eine relative Zunahme des sfGFP-Signals wurde bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden in Abwesenheit von NK-Zellen ermittelt. Im direkten Vergleich führte dabei die Ko-Kultur mit NK-Zellen zu einer geringfügigen Abnahme des Reporter-Signals gegenüber Organoiden, die ohne NK-Zellen kultiviert wurden. Allerdings konnte zu keinem Zeitpunkt des Experiments ein signifikanter Unterschied zwischen den

Gruppen festgestellt werden. Eine deutlich erhöhte Lyse wurde hingegen bei der Ko-Inkubation von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden mit NK-92/5.28.z Zellen beobachtet, in welcher mit fortschreitender Kultivierungsdauer eine kontinuierliche Signalreduktion zu verzeichnen war. Bereits nach 2-stündiger Inkubation zeigten sich signifikante Unterschiede sowohl gegenüber der Ko-Kultur mit parentalen NK-92 Zellen als auch gegenüber Organoiden, die ohne NK-Zellen kultiviert wurden. Zwischen Ko-Kulturen von ErbB2-exprimierenden Organoiden mit parentalen NK-92 Zellen oder ohne Effektorzellen ergab sich kein signifikanter Unterschied. Dies weist eine spezifische CAR-vermittelte Lyse durch NK-92/5.28.z Zellen nach.

Da sich p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen hinsichtlich neoplastischer Treibermutationen lediglich durch die zusätzliche Expression von ErbB2 unterscheiden, wurde ein direkter Vergleich zwischen den beiden Linien durchgeführt (siehe Tab. 4.1, unten). Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in Ko-Kulturen mit parentalen NK-92 Zellen verzeichnet werden. Im Gegensatz dazu wurden ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch NK-92/5.28.z-Zellen bereits nach einer 2-stündigen Ko-Inkubation effektiver abgetötet und zeigten über den gesamten Zeitraum des Experiments eine signifikant höhere Lyse im Vergleich zu ErbB2-negativen Organoiden, die mit CAR-exprimierenden NK-Zellen kultiviert wurden.

**Tab. 4.1: Statistische Analyse des Zeitraffer-Experiments mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und luc2-sfGFP-exprimierenden Mamma-Organoiden:** Angegeben sind die p-Werte aus fünf unabhängigen Experimenten (mit jeweils 3-8 Organoiden pro Ansatz) zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments (siehe Abb. 4.24 B).

Gruppe	p-Wert zum Zeitpunkt:					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12h
<b>p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup></b>						
NK-92 vs. Organoide allein	0,016755	0,016710	0,012113	0,011406	0,005472	0,002885
NK-92/5.28.z vs. Organoide allein	0,001012	0,005050	0,006820	0,002908	0,001648	0,000891
NK-92 vs. NK-92/5.28.z	0,232362	0,282948	0,270776	0,249231	0,271326	0,397737
<b>p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup></b>						
NK-92 vs. Organoide allein	0,773108	0,949242	0,451781	0,454169	0,303339	0,315448
NK-92/5.28.z vs. Organoide allein	0,929051	0,979038	0,158341	0,123915	0,086541	0,074044
NK-92 vs. NK-92/5.28.z	0,883720	0,983735	0,393240	0,260421	0,350472	0,341308
<b>ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup></b>						
NK-92 vs. Organoide allein	0,887545	0,424708	0,437240	0,437212	0,346942	0,182894
NK-92/5.28.z vs. Organoide allein	0,001478	0,000144	0,000515	0,000313	0,000277	0,000382
NK-92 vs. NK-92/5.28.z	0,003971	0,005294	0,011146	0,008244	0,008983	0,002575
<b>p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> vs. ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup></b>						
NK-92	0,606826	0,822727	0,611314	0,571185	0,639777	0,585159
NK-92/5.28.z	0,014274	0,003830	0,001905	0,002398	0,003173	0,002568

Die hier ermittelten Daten weisen eine direkte CAR-vermittelte Zytotoxizität von NK-92/5.28.z Zellen gegen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden in Echtzeit nach. Neben einer kinetischen Untersuchung ermöglicht das eingesetzte Bildgebungsverfahren zudem die Bestimmung der Zielzell-Lyse in

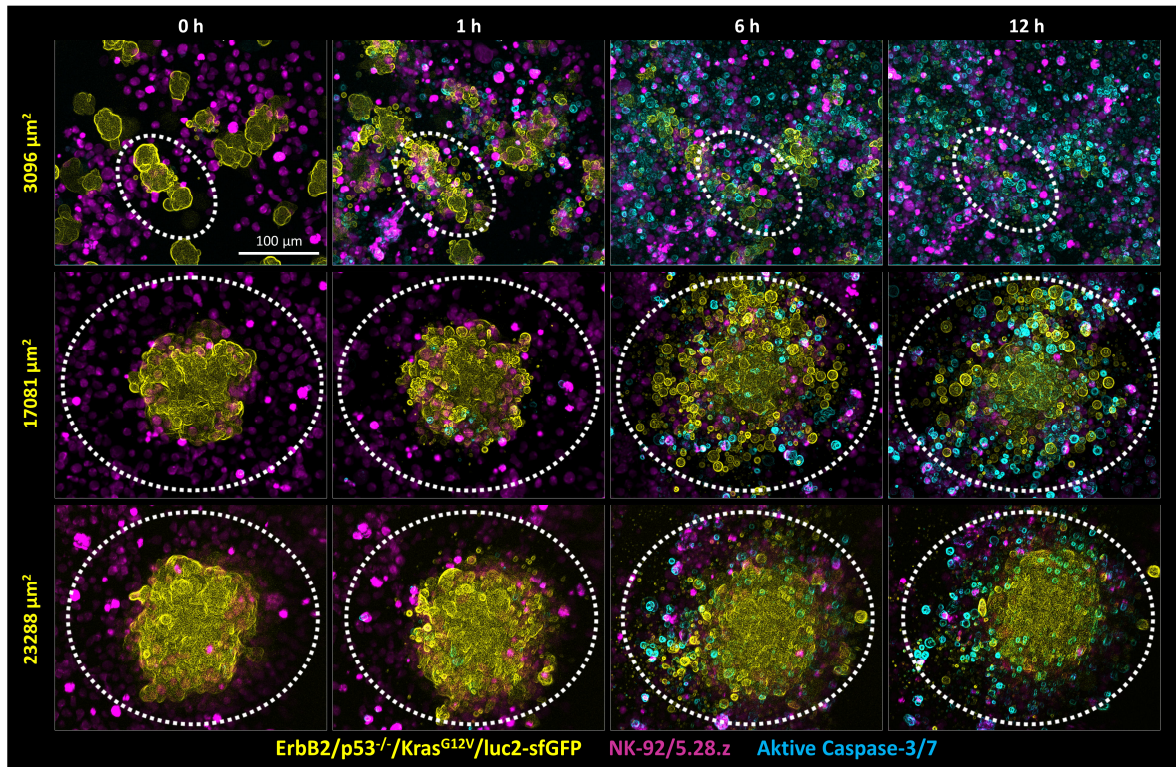


Abhängigkeit von der Organoid-Fläche. Die dargestellten repräsentativen Aufnahmen zeigen die Zytotoxizität von NK-92/5.28.z Zellen gegen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden unterschiedlicher Größe (siehe Abb. 4.25 A). Während Organoiden mit geringer Fläche (siehe Abb. 4.25 A, oben) bereits nach 6 h nahezu vollständig lysiert waren, konnten zu diesem Zeitpunkt apoptotische Zellen lediglich im äußeren Bereich von größeren Organoiden beobachtet werden (siehe Abb. 4.25 A, unten). Dies deutet auf eine größenabhängige Lyse der Organoiden durch NK-Zellen hin. Um die Abhängigkeit der Lyse von der Organoid-Größe näher zu untersuchen, wurde eine Korrelationsanalyse durchgeführt. Dafür wurden die Fläche individueller Organoiden zu Beginn des Experiments und die relative Signalveränderung (sfGFP) nach 12-stündiger Inkubation bestimmt und in einem Streudiagramm gegeneinander aufgetragen (siehe Abb. 4.25 B). Der lineare Zusammenhang zwischen der Organoid-Fläche und der relativen Signalveränderung (sfGFP) ist dabei in einer Regressionsgeraden dargestellt. Um die Richtung und Stärke des linearen Zusammenhangs und die statistische Relevanz zu bestimmen, wurden der Pearson Korrelationskoeffizient  $r$  sowie die zugehörigen  $p$ -Werte berechnet (siehe Tab. 4.2). Wie bereits unter Abschnitt 4.2.4 erwähnt, kann der Pearson Korrelationskoeffizient Werte zwischen -1 und 1 annehmen, bei welchen der Wert 0 keinen und die Werte -1 oder +1 einen vollständigen linearen Zusammenhang beschreiben. Ein positiver Korrelationskoeffizient definiert somit einen positiven linearen Zusammenhang zweier Variablen, welcher in dieser Analyse ein mit zunehmender Organoid-Größe steigendes Fluoreszenzsignal beschreibt. Der entgegengesetzte Verlauf, also ein abnehmendes Signal bei zunehmender Größe, wird über einen negativen Korrelationskoeffizienten nachgewiesen.

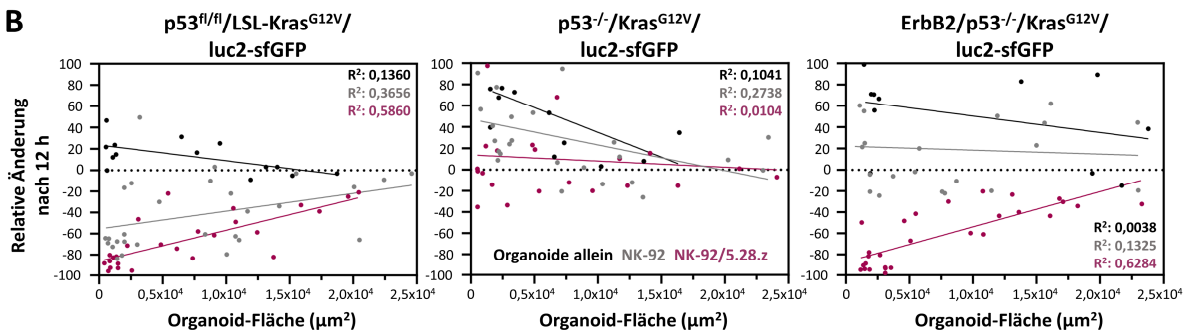
Ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen Organoid-Fläche und Signalintensität konnte bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden in Abwesenheit von NK-Zellen beobachtet werden. Die bei ansteigender Organoid-Größe geringere Zunahme des Signals äußerte sich dabei in einem negativen Korrelationskoeffizienten  $r$ . Daraus lässt sich schließen, dass Organoiden mit zunehmender Fläche ein reduziertes Wachstum aufweisen. Auch in der Regressionsgeraden von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden ohne Effektorzellen zeigte sich ein negativer linearer Zusammenhang zwischen Organoid-Größe und Ausmaß der Signalveränderung, dessen Korrelationskoeffizient allerdings keine statistische Signifikanz aufwies. Weiterhin zeigte diese Untersuchung, dass die Lyse von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch parentale ( $r=0,3688$ ) und CAR-exprimierende NK-92 Zellen ( $r=0,7623$ ) in Abhängigkeit von der Organoid-Fläche erfolgte. Dabei wurde ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Organoid-Fläche und der relativen Signaländerung ermittelt. Demnach bewirkte eine 12-stündige Ko-Inkubation mit NK-Zellen eine höhere Gesamtlyse je geringer die Fläche der Organoiden war. Für die Ko-Kultur von NK-Zellen und p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden wurde dagegen eine negative Korrelation festgestellt. Wie oben beschrieben, wurde dies allerdings auch in Abwesenheit von NK-

Zellen beobachtet und deutet somit auf ein von der Organoid-Ausgangsfläche abhängiges, nicht von den Effektorzellen beeinflusstes Wachstum hin.

**A**



**B**



**Abb. 4.25 NK-Zell-vermittelte Lyse in Abhängigkeit von der Organoid-Größe. (A)** Mikroskopische Analyse von NK-92/5.28.z Zellen (magenta) in Ko-Kultur mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Organoiden (gelb) in Gegenwart des Caspase-3/7-Biotrackers (cyan). Dargestellt sind prozessierte Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) von Organoiden unterschiedlicher Größe (3096-, 17081- und 23288  $\mu\text{m}^2$ ) zum Zeitpunkt 0, 1, 6 und 12 h. **(B)** Korrelationsanalyse der größenabhängigen Lyse von Organoiden durch NK-Zellen. Mit Hilfe der Software ImageJ wurden MIP-basierte *Hyperstacks* generiert, die MFI des sfGFP-Signals zu Beginn (0 h) und am Ende (12 h) des Experiments bestimmt und die relative Veränderung des Signals ermittelt. Die Lyse nach 12 h wurde gegen die Organoid-Größe ( $\mu\text{m}^2$ ) aufgetragen. Gezeigt sind Streudiagramme von individuellen Organoiden mit zugehörigen linearen Regressionen und  $R^2$ -Werten aus fünf unabhängigen Experimenten.

Ein hoch signifikanter linearer Zusammenhang wurde hingegen für Ko-Kulturen von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden mit NK-92/5.28.z Zellen festgestellt ( $r=0,7927$ ). Dies zeigt, dass bei gleicher Inkubationszeit die spezifische, CAR-vermittelte Lyse der Organoid-Fläche abnimmt.



**Tab. 4.2: Linearer Zusammenhang zwischen NK-Zell-vermittelter Lyse und Organoid-Größe:** Angegeben sind der Pearson Korrelationskoeffizient  $r$  und die zugehörigen  $p$ -Werte (Asymptotische Signifikanz).  $r=-1$ : vollständig negative Korrelation;  $r=0$ : keine Korrelation;  $r=1$ : vollständig positive Korrelation.

Organoid-Linie	Pearson Korrelationskoeffizient ( $r$ ) und $p$ -Wert der Kondition:		
	Organoid allein	NK-92	NK-92/5.28.z
p53 <sup>fl/fl</sup> /LSL-Kras <sup>G12V</sup>	$r=-0,6047$ $p=0,0220$	$r=0,3688$ $p=0,0534$	$r=0,7623$ $p<0,0001$
p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup>	$r=-0,6070$ $p=0,0278$	$r=-0,4239$ $p=0,0347$	$r=-0,1020$ $p=0,6514$
ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup>	$r=-0,3640$ $p=0,2711$	$r=-0,06237$ $p=0,7883$	$r=0,7927$ $p<0,0001$

#### 4.3.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.3.1 – 4.3.3

In den hier durchgeführten Analysen wurde die Anti-Tumor-Aktivität von NK-Zellen gegen murine Mamma-Epithelzellen untersucht. In 4-stündigen Ko-Kulturen konnte eine ErbB2-abhängige Aktivierung von CAR-NK-Zellen und eine ErbB2-spezifische Lyse von dissoziierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurden Assays etabliert, welche es ermöglichen, die NK-Zell-vermittelte Lyse von 3D-Kulturen zu untersuchen. In Langzeit-Ko-Kulturen von 24 h wurde dabei ein von ErbB2 unabhängiges Abtöten von Zielzellen beobachtet. Bei einer verkürzten Ko-Kultivierung von 12 h konnte jedoch im Vergleich zu p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden eine spezifische Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch CAR-exprimierende NK-Zellen nachgewiesen werden. Weiterhin wurde bei einer 12-stündigen Ko-Inkubation ein positiver linearer Zusammenhang zwischen Organoid-Fläche (ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>) und Gesamtlyse durch CAR-NK-Zellen ermittelt.

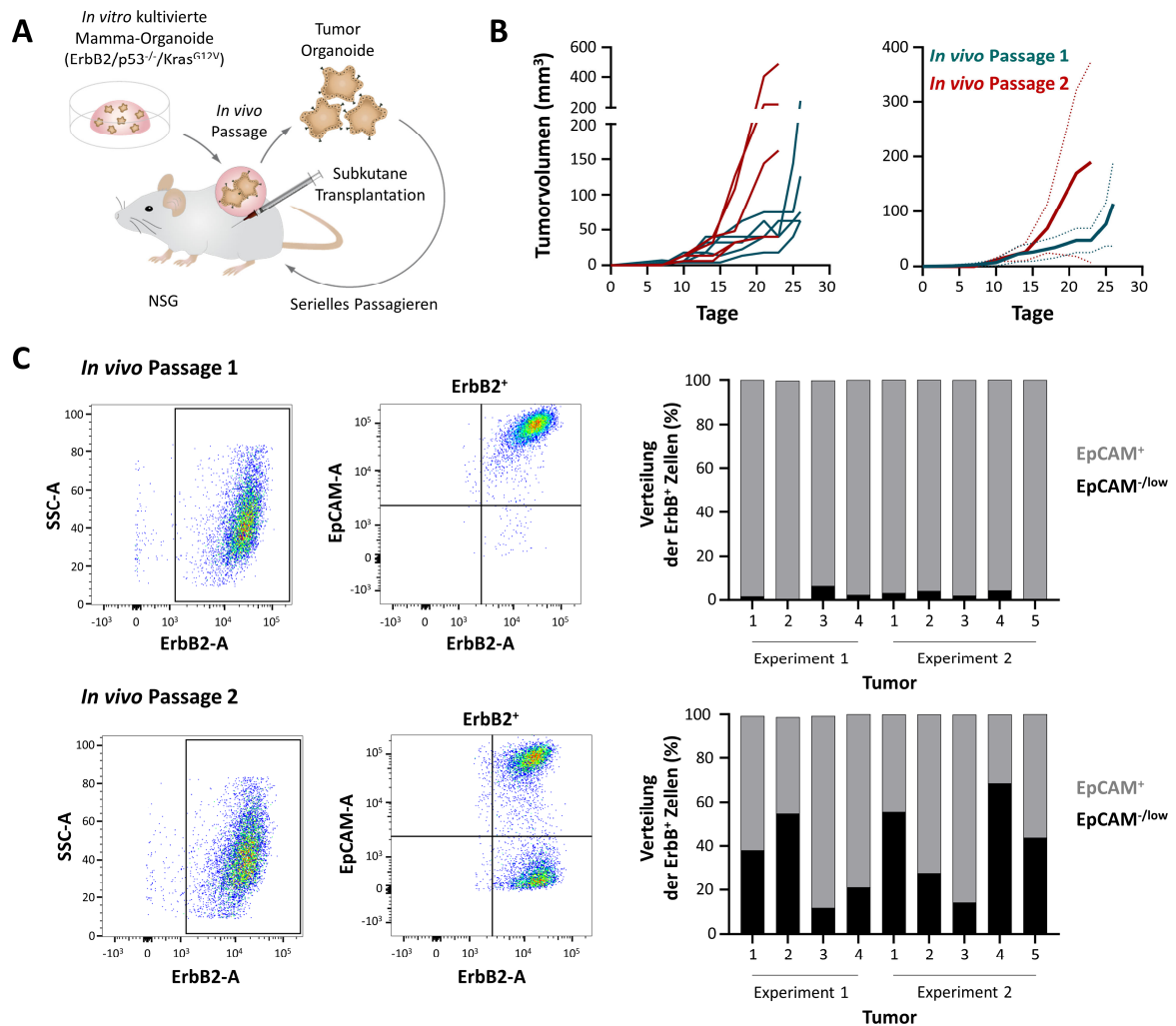
## 4.4 Plastizität aus Mamma-Organoiden generierter Tumoren

In den vorangegangenen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass Organoide die Komplexität und zelluläre Heterogenität von Organen besser widerspiegeln als traditionelle 2D-Kulturen. Dennoch kann die Interaktion von Krebszellen mit Zellen und löslichen Faktoren des Tumormikromilieus derzeit nur im lebenden Organismus ausreichend untersucht werden. Um Aufschluss über die Tumorigenität der etablierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen zu erhalten und zudem zu prüfen, ob sich diese Zellen für die Etablierung eines Mausmodells zur Analyse ErbB2-spezifischer Therapieansätze eignen, wurden Mamma-Organoide in immundefiziente und immunkompetente Mäuse transplantiert.

### 4.4.1 *Engraftment* und seriell Passagieren muriner Mamma-Organoide

Um zu testen, ob die neoplastischen Treibermutationen in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden für eine vollständige maligne Transformation ausreichen, wurde zunächst die Tumorigenität der Zellen nach einer subkutanen Transplantation in NSG-Mäusen überprüft. NSG-Mäuse verfügen zwar nicht über ein intaktes Immunsystem, können aber ein funktionales Tumorstroma mit extrazellulären Matrixproteinen und *Cancer-associated fibroblasts* (CAFs) ausbilden, welches die Tumorprogression nach subkutaner Transplantation neoplastischer Zellen beeinflussen kann (Maykel *et al*, 2014). Daher wurde neben dem *Engraftment* der Organoide auch untersucht, ob aus ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen nach seriellem *in vivo* Passagieren Derivate mit unterschiedlicher Tumorigenität hervorgehen. Dafür wurden *in vitro* kultivierte Organoide enzymatisch vereinzelt und 1x10<sup>6</sup>-Zellen subkutan in die Flanke von NSG-Mäusen transplantiert. Angewachsene Tumoren wurden etwa 4 Wochen nach der Transplantation entfernt, zu Organoiden aufbereitet und expandiert, sodass ErbB2<sup>+</sup>-Tumorzellen sortiert werden konnten. Die so etablierten Tumor-Organoide wurden anschließend erneut *in vivo* passagiert (siehe Abb. 4.26 A). Das Wachstum der Tumoren individueller Tiere und das durchschnittliche Tumorwachstum der ersten und zweiten Transplantationsrunde wurde regelmäßig dokumentiert und in einer Wachstumskinetik zusammengefasst (siehe Abb. 4.26 B). Dabei wurde zunächst ein vergleichbares Anwachsen der Tumorzellen in den Tieren beobachtet. In der zweiten *in vivo* Passage zeigte sich allerdings mit fortschreitendem Verlauf ein gesteigertes Wachstum der Tumoren im Vergleich zur ersten Passage.

FACS-angereicherte Tumorzellen der beiden *in vivo* Passagen wurden jeweils zu Organoiden aufbereitet und nachfolgend auf die Expression des Pan-Epithelzellmarkers EpCAM untersucht (siehe Abb. 4.26 C). Während in zwei unabhängigen Experimenten nahezu alle Organoide der ersten *in vivo* Passage EpCAM exprimierten, wurde in Tumor-Organoiden der zweiten Passage eine Population aus ErbB2<sup>+</sup>-Zellen mit verminderter oder nicht mehr vorhandener EpCAM-Expression identifiziert.



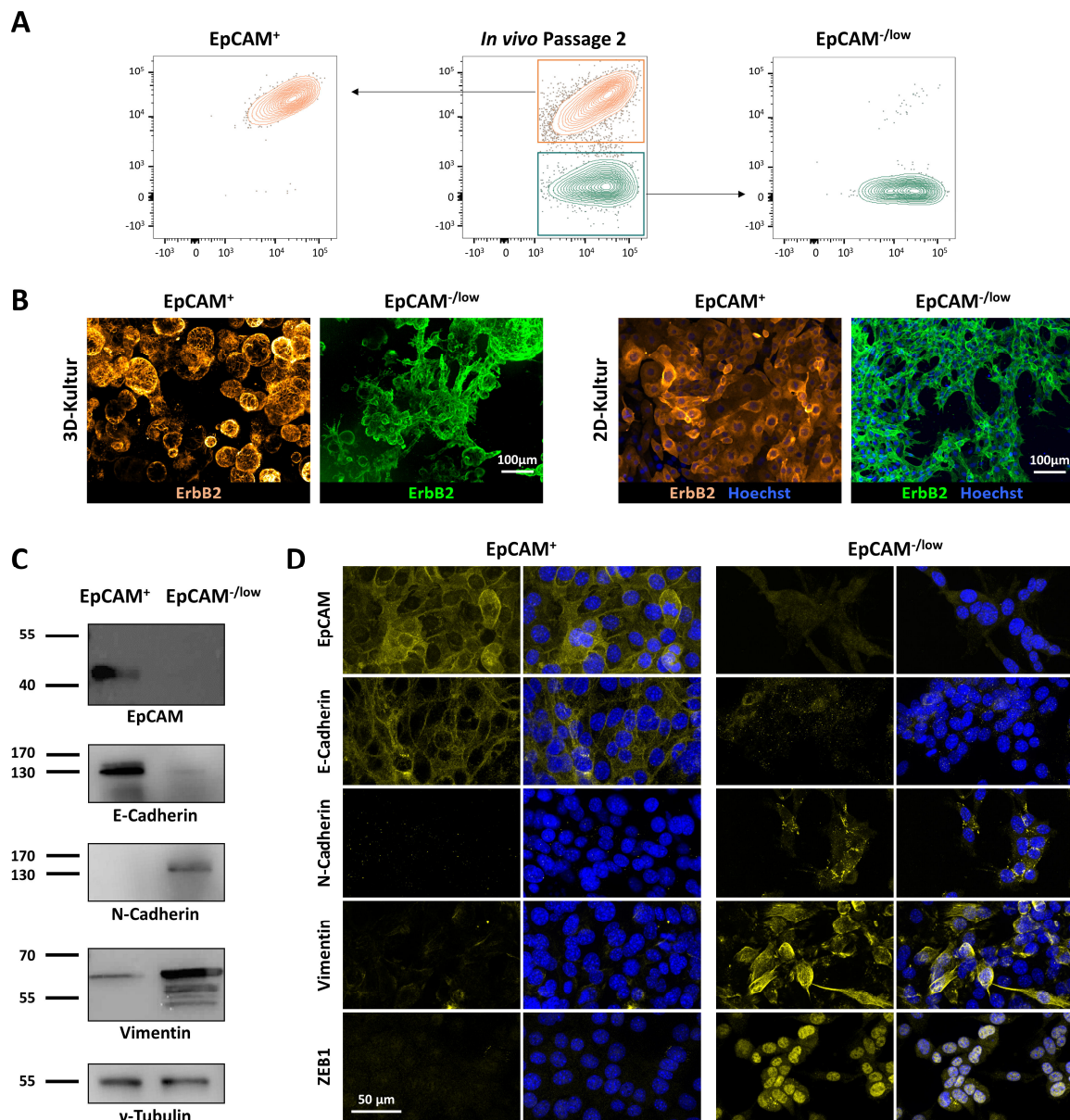
**Abb. 4.26 Tumor-Plastizität nach seriellen *in vivo* Passagieren.** (A) Schematische Darstellung des seriellen *in vivo* Passagierens der Mamma-Organoiden. ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden wurden aus Matrigel isoliert, als Einzelzellsuspension aufbereitet und 1x10<sup>6</sup>-Zellen subkutan in die Flanke von NSG-Mäusen transplantiert. Tumoren wurden nach 25-30 Tagen isoliert, in Matrigel expandiert und durchflusszytometrisch auf ErbB2<sup>+</sup>-Zellen angereichert. Tumor-Organoiden wurden anschließend erneut *in vivo* passagiert. (B) Kinetik des Tumorwachstums. Die Tumorzellvolumina wurden im Abstand von 2-3 Tagen bestimmt. Dargestellt ist das Tumorwachstum von fünf individuellen Tieren (links) der *in vivo* Passage 1 (türkis) und Passage 2 (rot) sowie das mittlere Tumorwachstum (rechts) ± SD eines repräsentativen Experiments. (C) EpCAM-Expression der Tumor-Organoid-Kulturen aus einfach und zweifach *in vivo* passagierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen. Aus Organoiden abgeleitete Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression des Markers EpCAM untersucht. Dabei zeigen Dotplots die Verteilung der EpCAM-Expression aus jeweils einer repräsentativen Organoid-Kultur der *in vivo* Passage 1 und 2 (links). Die prozentuale Verteilung der EpCAM-Expression aus ErbB2-FACS angereicherten Kulturen ist jeweils für zwei individuelle Experimente der *in vivo* Passage 1 (oben) und 2 (unten) graphisch dargestellt (rechts).

#### 4.4.2 Plastizität *in vivo* passagierter Mamma-Organoiden

Krebserkrankungen epithelialen Ursprungs sind in der Regel zunächst durch die Expression von EpCAM gekennzeichnet. Der Verlust oder die Herunterregulation dieses Adhäsionsmoleküls weist meist auf eine fortschreitende Tumorprogression hin, in welcher Tumorzellen die Fähigkeit zur Metastasierung erlangen können. Einen entscheidenden Prozess bei der Entstehung von Metastasen stellt die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) dar, durch welche die Motilität und Invasivität von Tumorzellen gesteigert wird. Dabei wird die Transition zu einem mesenchymalen Phänotyp unter anderem durch

eine transkriptionelle Repression von Adhäsionsmolekülen wie beispielsweise EpCAM vorangetrieben (Skrypek *et al*, 2017). Aus diesem Grund wurde hier die Heterogenität der Tumor-Organoid hinsichtlich phänotypischer Veränderungen und EMT-Marker weiter untersucht. Dafür wurden EpCAM<sup>+</sup> und EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen eines repräsentativen Organoid-Derivats der zweiten *in vivo* Passage jeweils durchflusszytometrisch angereichert (siehe Abb. 4.27 A). In einer anschließenden mikroskopischen Analyse wurden sowohl in 3D- als auch in 2D-Kulturen phänotypische Veränderungen beobachtet (siehe Abb. 4.27 B). Während EpCAM-exprimierende Zellen eine homogene Kultur aus unverzweigten Organoiden generierten, wiesen EpCAM<sup>-/low</sup>-Organoiden starke Verzweigungen auf und bildeten großflächige zelluläre Netzwerke. Auch in 2D-Kulturen zeigten sich morphologische Veränderungen dahingehend, dass EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen durch einen mesenchymalen Phänotyp aus verzweigten Zellen mit langen Zellfortsätzen gekennzeichnet waren.

In einer Immunoblot-Analyse wurde die Expression weiterer EMT-Marker untersucht (siehe Abb. 4.27 C). Erwartungsgemäß konnte dabei das unterschiedliche EpCAM-Expressionsniveau der EpCAM<sup>+</sup> und EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen bestätigt werden. Weiterhin zeichneten sich EpCAM<sup>+</sup>-Zellen durch eine starke Expression des epithelialen Markers E-Cadherin, die Abwesenheit des mesenchymalen Markers N-Cadherin und eine geringe Expression von Vimentin aus. Im Gegensatz dazu zeigten EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen eine verstärkte Expression von Vimentin und N-Cadherin, während E-Cadherin nur geringfügig detektiert werden konnte. Dies konnte auch in einer mikroskopischen Immunfluoreszenz-Analyse bestätigt werden (siehe Abb. 4.27 D). Neben den bereits genannten EMT-Markern wurde dabei außerdem die Expression des Transkriptionsfaktors *Zinc finger E-box binding homeobox 1* (ZEB1) untersucht, welcher in den Zellkernen von EpCAM<sup>-/low</sup>-, nicht aber in EpCAM<sup>+</sup>-Zellen nachgewiesen werden konnte. ZEB1 gilt als direkter EMT-Aktivator, der zudem die Plastizität von Tumorzellen stimuliert (Wu *et al*, 2020; Zhang *et al*, 2015). Serielles Passagieren von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden führte somit zu einer erhöhten intratumoralen Heterogenität. Die molekularen Veränderungen des Tumors blieben dabei offensichtlich in nachfolgenden *in vitro* Tumor-Organoid-Kulturen weitestgehend erhalten.



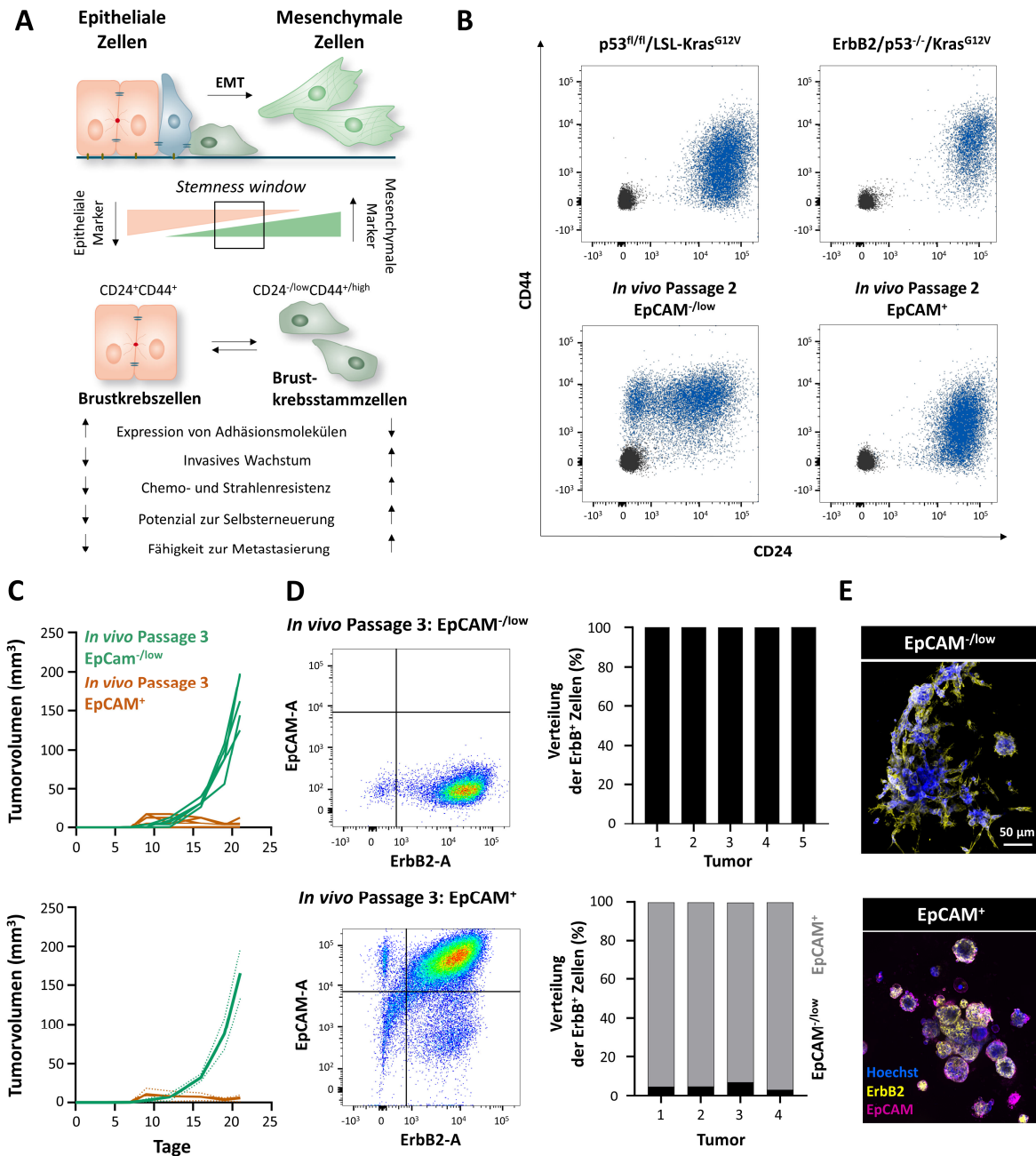
**Abb. 4.27 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) *in vivo* passagierter Organoide.** (A) Durchflusszytometrische Anreicherung  $\text{EpCAM}^{\text{low}}$  und  $\text{EpCAM}^{\text{+}}$ -Epithelzellen. Zweifach *in vivo* passagierte, ErbB2-FACS angereicherte Tumor-Organoide wurden zu einer Einzelzellsuspension aufbereitet und mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper gegen EpCAM gefärbt.  $\text{EpCAM}^{\text{low}}$ - (grün) und  $\text{EpCAM}^{\text{+}}$ -Epithelzellen (orange) wurden mittels FACS angereichert. (B) Morphologische Unterschiede von  $\text{EpCAM}^{\text{low}}$  (grün) und  $\text{EpCAM}^{\text{+}}$ -Epithelzellen (orange). Dargestellt sind Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) von Epithelzellen in 3D- (links) oder 2D-Kultur (rechts), die mit einem Fluorochrom-gekoppeltem Antikörper gegen ErbB2 gefärbt wurden. (C) Analyse von EMT-Markern mittels Immunoblot. In einer Immunoblot-Analyse erfolgte der Nachweis von EpCAM, E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin und  $\gamma$ -Tubulin (Ladekontrolle). (D) Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von EMT-Markern.  $\text{EpCAM}^{\text{low}}$ - und  $\text{EpCAM}^{\text{+}}$ -Epithelzellen in 2D-Kultur wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend Antikörperfärbungen gegen EpCAM, E-Cadherin, N-Cadherin, Vimentin und ZEB1 in Kombination mit Spezies-spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern unterzogen. Zudem erfolgte eine Gegenfärbung mit Hoechst. Dargestellt sind repräsentative Maximumintensitätsprojektionen des EMT-Markers allein (links, gelb) oder in Kombination mit Hoechst (rechts, blau) bei 60-facher Vergrößerung.

In  $\text{EpCAM}^{\text{low}}$ - und  $\text{EpCAM}^{\text{+}}$ -Zellen wurde eine differenzielle Expression von epithelialen und mesenchymalen Markern beobachtet. Dies weist auf eine Aktivierung der EMT hin. Während der EMT (siehe Abb. 4.28 A) treten nicht nur rein epitheliale oder mesenchymale Zellen auf, vielmehr ist dieser

Prozess in der Tumorprogression als eine schrittweise Umwandlung zu verstehen, in welcher intermediäre Zellen mit hybriden Phänotyp existieren (Brabletz *et al*, 2021; Sinha *et al*, 2020). Da Tumorstammzellen (engl., *Cancer stem cell*, CSC) diese hybriden Eigenschaften teilen, ist eine partielle und/oder fortschreitende EMT ein möglicher Hinweis auf die Entstehung von CSCs (Jolly *et al*, 2015; Kröger *et al*, 2019; Nie, 2018). Tumorstammzellen zeichnen sich durch das Potenzial der Selbsterneuerung und der erhöhten Resistenz gegen Chemo- und Strahlentherapie aus.

Beim Mammakarzinom und anderen Tumorentitäten können Tumorstammzellen durch einen CD24<sup>-</sup>/lowCD44<sup>+/high</sup>-Phänotyp identifiziert werden (Camerlingo *et al*, 2014; Jaggupilli & Elkord, 2012; Sheridan *et al*, 2006). Daher wurden EpCAM<sup>-/low</sup>- und EpCAM<sup>+</sup>-Zellen auf die Expression von CD24 und CD44 untersucht. Als Kontrollen dienten die Ausgangslinien p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>. In einer durchflusszytometrischen Analyse wurden dabei Unterschiede in der Expression der Marker beobachtet (siehe Abb. 4.28 B). Während p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> sowie zweifach *in vivo* passagierte EpCAM<sup>+</sup>-Zellen eine starke und homogene CD24 Expression aufwiesen, konnte in zweifach *in vivo* passagierten EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen eine CD24<sup>-</sup>-Population beobachtet werden. Weiterhin zeigten p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup> und zweifach *in vivo* passagierte EpCAM<sup>+</sup>-Zellen ein schwächeres CD44-Signal ( $\Delta$  MFI: 2244 und 2002) als ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> und zweifach *in vivo* passagierte EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen ( $\Delta$  MFI: 5746 und 5365). Die verstärkte Expression von CD44 bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD24 deutet darauf hin, dass EpCAM<sup>-/low</sup>-Organoide eine Population aus Tumorstammzellen enthalten. Da Tumorstammzellen auch durch invasiveres Wachstum und eine gesteigerte Tumorigenität gekennzeichnet sind, wurden zweifach *in vivo* passagierte EpCAM<sup>+</sup>- und EpCAM<sup>-/low</sup>-Organoide erneut in NSG-Mäusen passagiert. Während Tumoren der EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen eine kontinuierliche Zunahme des Tumolvolumens aufwiesen, zeigten Tumoren der EpCAM<sup>+</sup>-Zellen ein stagnierendes Wachstum. In der Tumorstadiumskinetik individueller Tiere sowie dem durchschnittlichen Tumorstadium der EpCAM<sup>-/low</sup> und EpCAM<sup>+</sup>-Zellen (siehe Abb. 4.28 C) konnte dabei ein signifikanter Wachstumsvorteil der EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen ab Tag 14 ermittelt werden ( $p=0,000066$ ). Die durchflusszytometrische Analyse der EpCAM-Expression (siehe Abb. 4.28 D) isolierter ErbB2<sup>+</sup>-Tumorzellen zeigte zudem, dass transplantierte EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen einen stabilen Phänotyp aufwiesen. Hingegen hatten EpCAM<sup>+</sup>-Zellen nach der Transplantation zwar größtenteils weiterhin eine hohe EpCAM-Expression, allerdings wurde erneut eine ErbB2<sup>+</sup>-Population mit herabregulierter EpCAM-Expression beobachtet. In einer mikroskopischen Analyse (siehe Abb. 4.28 E) wurden wie zuvor morphologische Unterschiede der Organoid-Derivate festgestellt (vgl. siehe Abb. 4.27 B).





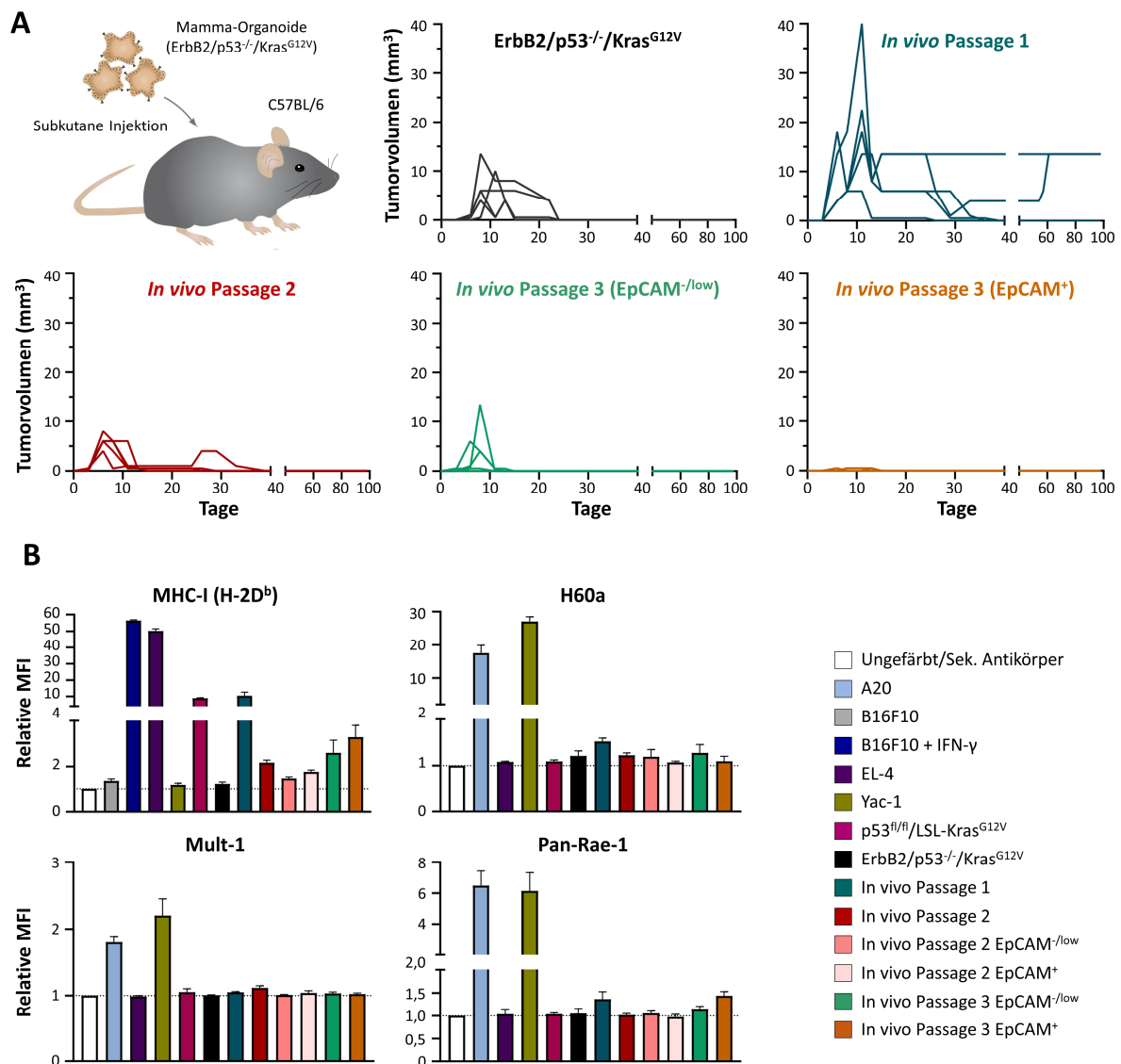
**Abb. 4.28 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) und Krebsstammzellen.** (A) Schematische Darstellung der Entstehung und Eigenschaften von Krebsstammzellen. Die reversible Transition von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften umfasst unterschiedliche Stadien mit graduellem Verlust von Adhäsionsmolekülen. EMT fördert die Entstehung und den Erhalt von Krebsstammzellen. Beim Mammakarzinom lassen sich diese durch ein CD24<sup>-/low</sup>/CD44<sup>+</sup>-Expressionsmuster identifizieren und zeichnen sich durch eine gesteigerte Chemo- und Strahlenresistenz und ein invasiveres Wachstum aus. (B) CD24- und CD44-Expression als prädiktive Marker von Krebsstammzellen des Mammakarzinoms. Organoiden wurden dissoziiert, mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen CD24 und CD44 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (C) Kinetik des Tumorwachstums. Die Tumorzellvolumina wurden im Abstand von 2-3 Tagen bestimmt. Dargestellt ist das Tumorwachstum von fünf individuellen Tieren (oben) sowie das mittlere Tumorwachstum ± SD (unten) der *in vivo* Passage von 3 EpCAM<sup>-/low</sup>- (grün) und EpCAM<sup>+</sup>-Zellen (orange). (D) EpCAM-Expression von Tumor-Organoid-Kulturen der *in vivo* Passage 3. Aus Organoiden abgeleitete Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression der Marker EpCAM und ErbB2 untersucht. Dabei zeigen Dotplots die Verteilung der EpCAM-Expression aus jeweils einer repräsentativen Organoid-Kultur. Die prozentuale Verteilung der EpCAM-Expression aus ErbB2<sup>+</sup>-Tumorzellen ist für individuelle Organoid-Kulturen der dritten *in vivo* Passagen (EpCAM<sup>-/low</sup> und EpCAM<sup>+</sup>) graphisch dargestellt. (E) Morphologische Unterschiede von EpCAM<sup>-/low</sup>- und EpCAM<sup>+</sup>-Epithelzellen. Dargestellt sind Maximumintensitätsprojektionen (MIPs) von EpCAM<sup>-/low</sup>- (oben) und EpCAM<sup>+</sup>-Epithelzellen in 3D-Kultur, die mit Hoechst (blau) sowie Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern gegen ErbB2 (gelb) und EpCAM (magenta) gefärbt wurden.



Um zu testen, ob die etablierten Organoid-Derivate auch in C57BL/6-Mäusen *engraften* und sich somit zur Etablierung eines immunkompetenten *in vivo* Brustkrebsmodells eignen, wurden  $1 \times 10^6$ -Zellen der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden sowie Zellpools jeder *in vivo* Passage subkutan in die Flanke weiblicher Mäuse transplantiert und das Tumorstadium wurde über einen Zeitraum von 100 Tagen verfolgt (siehe Abb. 4.29 A). Anfänglich konnte dabei in allen Gruppen tatsächlich ein Anwachsen der Tumorzellen beobachtet werden, welches bei Zellen der zweiten *in vivo* Passage am deutlichsten und bei EpCAM<sup>+</sup>-Zellen der dritten *in vivo* Passage am geringsten war. Allerdings wurde etwa zwei Wochen nach Transplantation in allen Gruppen eine Abstoßung der Tumorzellen festgestellt. Lediglich zwei Tiere, denen Zellen der zweiten *in vivo* Passage injiziert wurden, zeigten einen kleinen, im Wachstum stagnierenden Tumor, welcher 100 Tage nach der Inokulation entfernt wurde. Zwar konnten die so erhaltenen Zellen mit Hilfe einer X-Gal-Färbung der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Ausgangslinie zugeordnet werden, allerdings wurde in einer durchflusszytometrischen Analyse ein Verlust der ErbB2-Expression verzeichnet (Daten nicht gezeigt).

Eine wahrscheinliche Ursache der Abstoßung könnte eine Immunreaktion der C57BL/6-Mäuse gegen die Tumorzellen sein. Daher wurden die Tumorzellen in einer durchflusszytometrischen Analyse auf die Expression von MHC-Klasse-I-Moleküle und NKG2D-Liganden untersucht (siehe Abb. 4.29 B), welche maßgeblich zur Immunogenität von entarteten Zellen beitragen. Zur Analyse der MHC-Klasse-I-Oberflächenexpression wurden die Zellen mit einem Linien-spezifischen anti-H2D<sup>b</sup>-Antikörper gefärbt. Als Kontrollen dienten H2D<sup>b</sup>-negative oder nur schwach exprimierende B16F10- und Yac-1-Zellen, sowie B16F10-Zellen nach IFN- $\gamma$ -Stimulation und EL-4-Zellen, die endogen eine hohe Expression von MHC-Klasse-I aufweisen. Die durchflusszytometrische Analyse zeigte eine mit den Negativkontrollen vergleichbare Reduktion der H-2D<sup>b</sup>-Expression bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und EpCAM<sup>-</sup>-Zellen der zweiten *in vivo* Passage. Alle weiteren Derivate wiesen eine deutliche Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen auf, wobei die höchste Expression auf Zellen der *in vivo* Passage 1 und 3 detektiert wurde. Die Untersuchung der NKG2D-Liganden erfolgte mittels einer Antikörperfärbung gegen H60a, Mult-1 und Rae-1. Als Kontrollen dienten die Liganden-positiven Zelllinien A20 und Yac-1 sowie die Liganden-negative Zelllinie EL-4. Während keines der Organoid-Derivate eine gesteigerte Expression von Mult-1 aufwies, zeigten einfach *in vivo* passagierte Zellen sowie EpCAM<sup>+</sup>-Zellen der *in vivo* Passage 3 eine geringe Expression von Rae-1. Außer p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und EpCAM<sup>+</sup>-Zellen der dritten *in vivo* Passage, wurde in allen Derivaten eine geringe Steigerung der H60-Expression festgestellt, die allerdings deutlich schwächer als die Oberflächenexpression der Zelllinien A20 und Yac-1 war. Somit konnte gezeigt werden, dass nahezu alle unterschiedlichen Derivate MHC-Klasse-I-Moleküle und/oder NKG2D-Liganden exprimieren und dadurch ein potenzielles Ziel für NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen

darstellen. Dies hat möglicherweise zu der beobachteten Abstoßungsreaktion in immunkompetenten Tieren beigetragen.

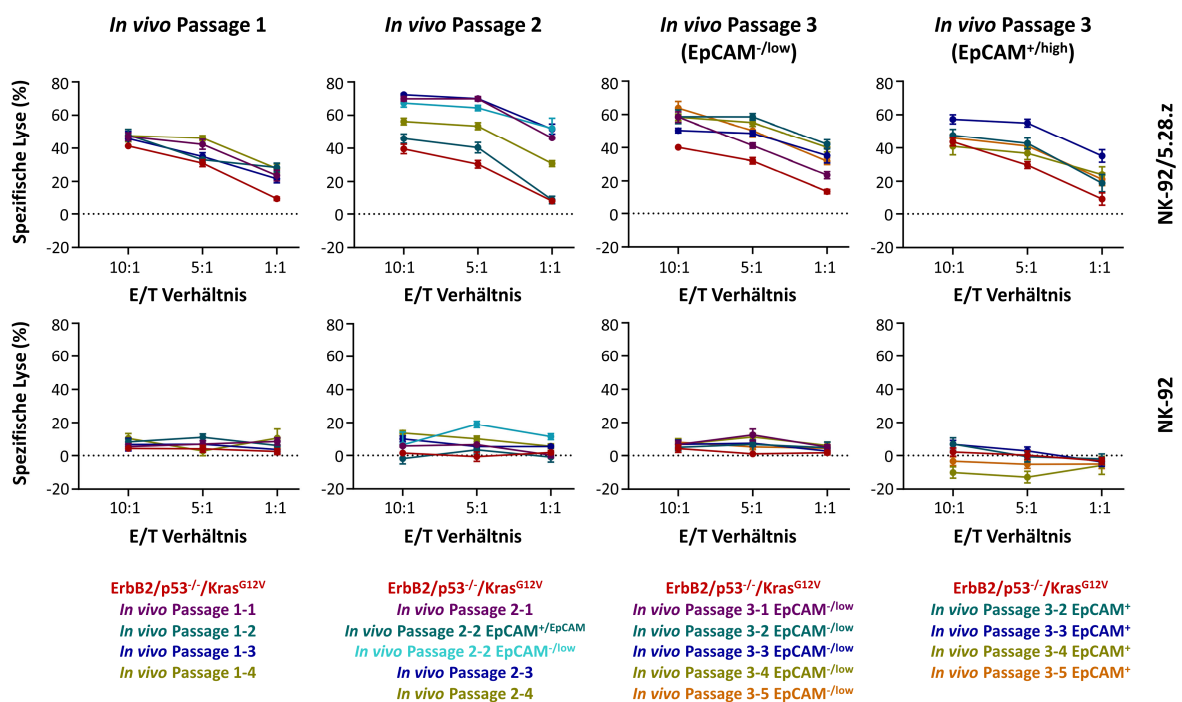


**Abb. 4.29 Engraftment *in vivo* passasierter ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen. (A) *In vivo* Engraftment seriell passasierter Mamma-Organoide. Jeweils 1x10<sup>6</sup> vereinzelt Zellen jeder Passage wurden subkutan in die Flanke weiblicher C57BL/6-Mäuse transplantiert. Die Tumorzumina wurden in regelmäßigen Abständen über einen Zeitraum von 100 Tagen dokumentiert. Dargestellt ist das Tumorzumwachstum von 4-5 individuellen Tieren jeder Passage. (B) Expression von H-2D<sup>b</sup> und NKG2D-Liganden. Aus Organoiden abgeleitete Einzelzellsuspensionen wurden durchflusszytometrisch auf die Oberflächenexpression der Marker H-2D<sup>b</sup>, H60a, Mult-1 und Rae-1 untersucht. Als Kontrollen für die MHC-Expression dienten B16F10-Zellen (+/- IFN-γ), sowie MHC-Klasse-I positive EL-4-Zellen. Für die Analyse der NKG2D-Liganden wurden Liganden-positive A20 und Yac-1- sowie Liganden-negative EL-4-Zellen mitgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD der MFI nach Normalisierung gegen unspezifisches Hintergrundsignal (Relative MFI).**

#### 4.4.3 Aktivität von CAR-NK-Zellen gegen *in vivo* passierte Mamma-Organoide

Durch das wiederholte *in vivo* Passagieren der Mamma-Organoide entstanden heterogene Kulturen mit EMT- und Stammzeleigenschaften. Da bei solchen Zellen eine erhöhte Resistenz gegen Standardtherapien aber auch immuntherapeutische Behandlungsansätze bestehen kann (Codony-

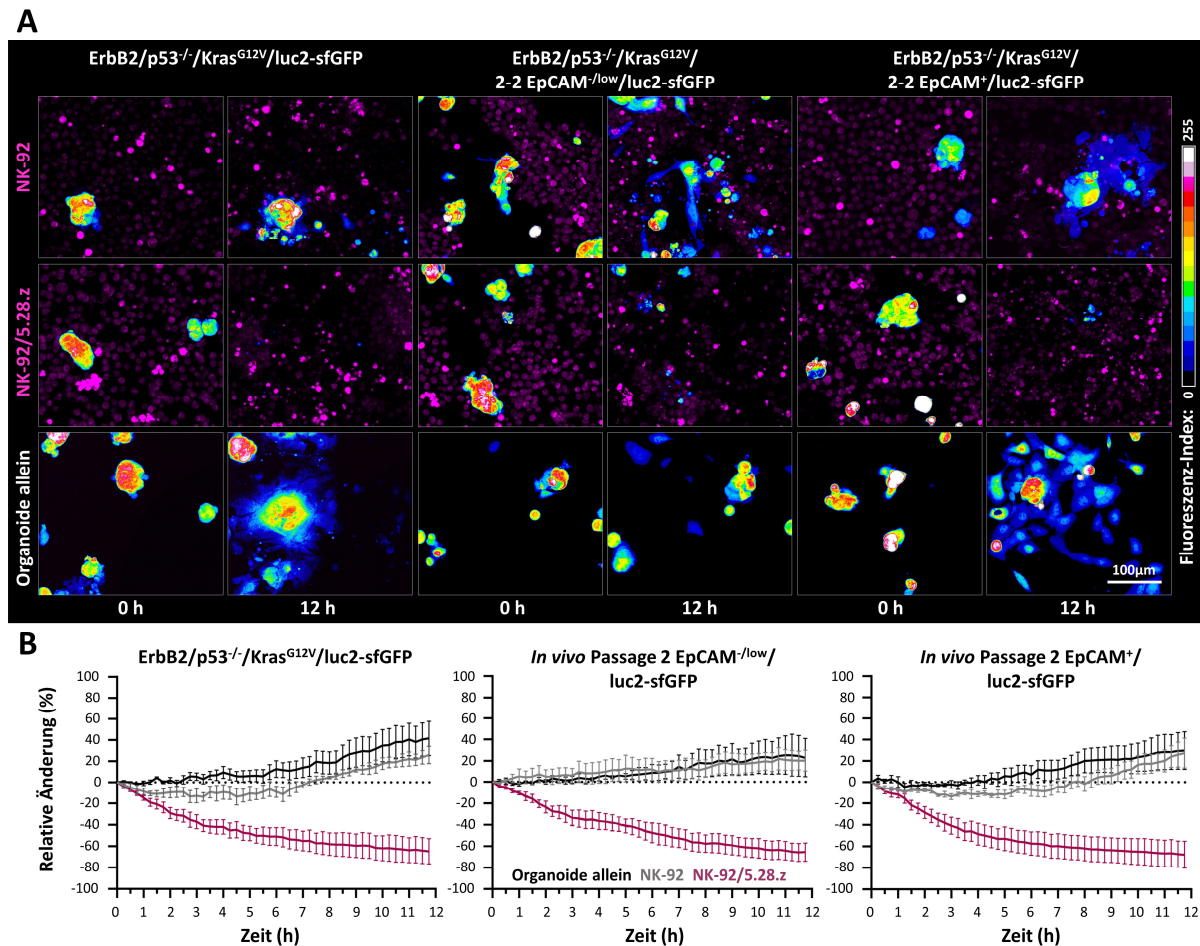
Servat & Rosell, 2015; Safa, 2022), wurde nachfolgend untersucht ob die erhaltenen Organoid-Derivate weiterhin sensitiv gegenüber CAR-NK-Zellen waren. Dafür wurden dissoziierte Zellen der einzelnen Tumor-Organoide jeder Passage mit parentalen und CAR-exprimierenden NK-Zellen für 4 h ko-kultiviert. Anschließend wurde die Lyse der Zielzellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Abb. 4.30). Als Kontrolle dienten die ursprünglichen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen. Hierbei wurde bei allen Zielzellen eine ErbB2-spezifische Lyse durch NK-92/5.28.z Zellen beobachtet. Diese war bei Zellen der ersten und EpCAM<sup>+</sup>-Zellen der dritten Passage vergleichbar mit der Ausgangslinie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>. Individuelle Derivate der zweiten und dritten Passage (EpCAM<sup>-</sup>) zeigten sogar eine leicht erhöhte Sensitivität gegenüber der NK-92/5.28.z-vermittelten Zytotoxizität.



**Abb. 4.30 Natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gegen dissoziierte *in vivo* passagierte Mamma-Organoide mit heterogenem Phänotyp.** Organoide wurden dissoziiert, in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen für 4 h mit parentalen (unten) oder ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen (oben) kultiviert und durchflusszytometrisch analysiert. Die Prozentzahlen der spezifischen Lyse wurden durch Subtraktion der spontanen Lyse ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von drei unabhängigen Experimenten.

In vorangegangenen Experimenten wurden Unterschiede in der Lyseaktivität von NK-Zellen gegen 2D- und 3D-Kulturen festgestellt (siehe Abb. 4.19). Daher wurde im Folgenden die Zytotoxizität der NK-Zellen gegen ausgewählte Tumor-Organoide nach *in vivo* Passage in 3D-Kultur untersucht. EpCAM<sup>-/low</sup>- und EpCAM<sup>+</sup>-Organoide der zweiten *in vivo* Passage wurden unter Verwendung des Transferplasmids pS-luc-V5-T2A-sfGFP-W (siehe Abb. 4.15 A) lentiviral transduziert. Die Zellen wurden mittels FACS angereichert, funktional charakterisiert (Daten nicht gezeigt) und anschließend in mikroskopischen Zeitrafferanalysen mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen ko-kultiviert. Zum Vergleich wurden Organoide der Ausgangszellen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> mitgeführt. In repräsentativen Aufnahmen

sind EpCAM<sup>-</sup>- und EpCAM<sup>+</sup>-Organotide der zweiten *in vivo* Passage und die ursprünglichen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organotide in Ko-Kultur mit NK-92, NK-92/5.28.z oder in Abwesenheit von NK-Zellen zum Zeitpunkt 0 h und nach 12 h gezeigt (siehe Abb. 4.31 A). Um Unterschiede in der Zelldichte zu veranschaulichen, wurde das sfGFP-Signal der Organotide in einer *16-Color-LUT* dargestellt.



**Abb. 4.31** Mikroskopie-basiertes Zytotoxizitätsassay mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und heterogenen Tumor-Organoiden. Luc2-sfGFP-exprimierende Organotide der *in vivo* Passage 2 wurden mit  $2 \times 10^5$  parentalen NK-92, ErbB2-spezifischen CAR-NK-92 oder ohne Effektorzellen für 12 h in einem Zeitraffer-Experiment analysiert. **(A)** Repräsentative MIPs eines Mikroskopie-basierten Zytotoxizitätsassays von Organoiden mit epithelialem (rechts) oder mesenchymalem Phänotyp (Mitte). Die Ausgangslinie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> diente als Kontrolle (links). Gezeigt sind Zeitpunkt 0 h und 12 h eines Zeitraffer-Experiments von Organoiden (*16-Color-LUT*) in Ko-Kultur mit parentalen NK-92 (oben), CAR-exprimierenden NK-92/5.28.z (Mitte) oder ohne die Zugabe von Effektorzellen (unten). **(B)** Kinetik der NK-92- und NK-92/5.28.z-vermittelten Lyse von Mamma-Organoiden. Mit Hilfe der Software ImageJ wurden MIP-basierte *Hyperstacks* generiert, die MFI des sfGFP-Signals bestimmt und diese anschließend gegen den Anfangswert normalisiert. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der prozentualen Veränderung von vier unabhängigen Experimenten, in welchen jeweils 3-8 Organotide pro Ansatz analysiert wurden.

Organotide, die ohne NK-Zellen kultiviert wurden, zeigten eine Zunahme des sfGFP-Signals, was auf eine Expansion der Zellen hindeutet. In Ko-Kulturen mit parentalen NK-92 Zellen wurden zwar eine Interaktion der Effektorzellen mit Organoiden und einzelne apoptotische Tumorzellen beobachtet, insgesamt konnte allerdings weiterhin eine Zunahme des sfGFP-Signals festgestellt werden. Hingegen wurden alle unterschiedlichen Organoid-Derivate bei Ko-Inkubation mit NK-92/5.28.z Zellen nahezu vollständig lysiert. Die durchschnittliche Lyse der Organotide wurde über eine Signalveränderung des

Reporters sfGFP bestimmt und in einer Kinetik zusammengefasst (siehe Abb. 4.31 B). Für ausgewählte Zeitpunkte wurde zudem die statistische Signifikanz der Zellyse bestimmt (siehe Tab. 4.3). Wie bereits zuvor beobachtet, wurden die ursprünglichen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden spezifisch durch NK-92/5.28.z Zellen abgetötet, während keine signifikante Lyse durch parentale NK-92 Zellen erfolgte (vgl. Abb. 4.24 B und Tab. 4.1). Eine CAR-vermittelte Zytotoxizität der NK-92/5.28.z Zellen wurde auch bei EpCAM<sup>-</sup> und EpCAM<sup>+</sup>-Organoiden der zweiten *in vivo* Passage beobachtet. Wie bei den ursprünglichen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen war eine erhöhte Lyse bereits nach 2 h sichtbar, welche sich mit fortschreitender Versuchsdauer weiter steigerte. Dabei konnten signifikante Unterschiede gegenüber der Ko-Kultur mit NK-92 und Organoiden ohne NK-Zell-Zugabe ermittelt werden. Alle unterschiedlichen Organoid-Derivate zeigten eine vergleichbare, sehr geringe Sensitivität gegenüber parentalen und eine sehr hohe Sensitivität gegenüber CAR-exprimierenden NK-Zellen (siehe Tab. 4.3). Diese Ergebnisse weisen nach, dass ErbB2-spezifische NK-Zellen unterschiedliche Derivate heterogener, Antigen-positiver Tumor-Organoid-Kulturen mit vergleichbarer Effizienz abtöten können.

**Tab. 4.3: Statistische Analyse des Zeitraffer-Experiments mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und luc2-sfGFP-exprimierenden heterogenen Tumor-Organoiden:** Angegeben sind die p-Werte aus vier unabhängigen Experimenten (mit jeweils 3-8 Organoiden pro Ansatz) zu verschiedenen Zeitpunkten des Experiments (siehe Abb. 4.31 B).

Gruppe	p-Wert zum Zeitpunkt:					
	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12h
<b>ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP</b>						
NK-92 vs. Organoiden allein	0,138919	0,099952	0,070983	0,285198	0,353590	0,436671
NK-92/5.28.z vs. Organoiden allein	0,004193	0,001217	0,001496	0,002182	0,002744	0,002487
NK-92 vs. NK-92/5.28.z	0,046174	0,020682	0,009300	0,008966	0,002987	0,001613
<b><i>In vivo</i> Passage 2 EpCAM<sup>-low</sup>/luc2-sfGFP</b>						
NK-92 vs. Organoiden allein	0,511348	0,739450	0,821370	0,770506	0,807990	0,906252
NK-92/5.28.z vs. Organoiden allein	0,016840	0,007732	0,003686	0,004122	0,005019	0,009940
NK-92 vs. NK-92/5.28.z	0,016224	0,014061	0,005718	0,001007	0,000625	0,000642
<b><i>In vivo</i> Passage 2 EpCAM<sup>+</sup>/luc2-sfGFP</b>						
NK-92 vs. Organoiden allein	0,065111	0,081986	0,231139	0,184053	0,670796	0,924825
NK-92/5.28.z vs. Organoiden allein	0,011771	0,009957	0,005467	0,004037	0,005472	0,011691
NK-92 vs. NK-92/5.28.z	0,028106	0,031445	0,011745	0,006561	0,002226	0,002406
<b>ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> luc2-sfGFP vs. <i>In vivo</i> Passage 2 EpCAM<sup>-low</sup>/luc2-sfGFP</b>						
NK-92/5.28.z	0,491697	0,623602	0,786762	0,964896	0,999273	0,961098
<b>ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> luc2-sfGFP vs. <i>In vivo</i> Passage 2 EpCAM<sup>+</sup>/luc2-sfGFP</b>						
NK-92/5.28.z	0,960731	0,609402	0,654906	0,815072	0,861409	0,865378
<b><i>In vivo</i> Passage 2 EpCAM<sup>-low</sup>/luc2-sfGFP vs. <i>In vivo</i> Passage 2 EpCAM<sup>+</sup>/luc2-sfGFP</b>						
NK-92/5.28.z	0,533419	0,389940	0,508844	0,765857	0,848208	0,885173

#### 4.4.4 Zusammenfassung der Abschnitte 4.4.1-4.4.3

Mit den hier beschriebenen Experimenten konnte die Tumorigenität der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen nach subkutaner Transplantation in NSG-Mäusen nachgewiesen werden. Durch serielles *in vivo* Passagieren der Mamma-Organoide in immundefizienten Tieren, konnten Zellderivate abgeleitet

werden, die sich durch einen Verlust oder einer Herunterregulation von epithelialen Markern und gleichzeitiger Expression von mesenchymalen Markern auszeichneten. Die so generierten Organoid-Derivate wiesen für eine EMT typische molekulare Veränderungen auf. Zudem wurden in von Tumoren abgeleiteten sekundären Organoid-Kulturen Zellen identifiziert, die einen charakteristischen Tumorstammzell-Phänotyp aufwiesen. *In vitro* Zytotoxizitätsstudien zeigten, dass die nach *in vivo* Passagieren erhaltenen heterogenen Tumor-Organoiden weiterhin sensitiv gegen eine ErbB2-spezifische Lyse durch CAR-exprimierende NK-92/5.28.z Zellen waren. Bei Transplantation der ursprünglichen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen und der davon abgeleiteten *in vivo* Passagen aus NSG-Mäusen in immunkompetente Tiere wurde nach einem anfänglichen *Engraftment* eine spontane Abstoßung der Tumoren beobachtet. Dies weist auf eine hohe Immunogenität dieser Tumoren hin.



## 5. Diskussion

Das Mammakarzinom ist weltweit die häufigste geschlechtsspezifische Krebserkrankung und gilt unter allen Tumorentitäten neben Lungenkrebs als häufigste krebsbedingte Todesursache für Frauen (Sung *et al*, 2021). Die Klassifizierung von Brustkrebs erfolgt anhand des TNM-Systems, des Nachweises spezifischer Rezeptoren und der Bestimmung des Ki67-Index. Eine Subklassifizierung stellt dabei das HER2 (ErbB2)-positive Mammakarzinom dar. ErbB2 wird bei 20-25 % der Tumoren von Brustkrebspatientinnen überexprimiert und ist mit einer erhöhten Resistenz gegenüber konventionellen Standardtherapien assoziiert (Gusterson *et al*, 1992; Harbeck *et al*, 2019; Langlands *et al*, 2013; Schlam & Swain, 2021). Durch die Implementierung von zielgerichteten Behandlungsansätzen gegen ErbB2 konnte die Prognose für Patientinnen mit dieser Subklassifizierung deutlich verbessert werden. Als etablierter Standard zur Behandlung des ErbB2-positiven Mammakarzinoms gilt daher eine Kombination aus Chemotherapie und den beiden ErbB2-spezifischen monoklonalen Antikörpern Trastuzumab und Pertuzumab als Erstlinientherapie (Gámez-Chiachio *et al*, 2022; Swain *et al*, 2022). Dennoch kann der Erfolg einer solchen Therapie eingeschränkt sein, da Tumorzellen primäre oder sekundäre Resistenzmechanismen erlangen können. Beispielsweise entwickeln etwa zwei Drittel der Patientinnen mit metastasierendem ErbB2-positivem Brustkrebs eine Resistenz gegen Trastuzumab. Die 8-Jahres-Überlebensrate beträgt bei diesen Patientinnen auch nach einer Kombinationstherapie mit Pertuzumab lediglich 37 % (Claret & Vu, 2012; Swain *et al*, 2020). Dies verdeutlicht die dringende Notwendigkeit alternativer Therapieansätze. Erwartet wird dabei, dass die konventionelle Antikörpertherapie in den nächsten Jahren von innovativen Therapieansätzen, wie beispielsweise dem adoptiven Transfer von CAR-Effektorzellen, abgelöst wird (Gámez-Chiachio *et al*, 2022).

Die in der Arbeitsgruppe Wels etablierte NK-Zelllinie NK-92/5.28.z exprimiert einen ErbB2-spezifischen CAR und wird derzeit in einer klinischen Phase-I-Studie bei Patienten mit rezidivierendem ErbB2-positivem Glioblastom evaluiert (Burger *et al*, 2019). In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass NK-92/5.28.z Zellen *in vitro* auch Trastuzumab-resistente Brustkrebszelllinien effizient abtöten (Zhang *et al*, 2017). Entsprechend könnte die Zelllinie eine alternative Behandlungsstrategie für Patientinnen mit ErbB2-positivem Brustkrebs darstellen. Um das Potenzial eines solchen ErbB2-gerichteten Zelltherapeutikums zu untersuchen, war Ziel dieser Arbeit, ein Organoid-basiertes, klinisch relevantes *in vitro* Modell des ErbB2-positiven Mammakarzinoms zu etablieren und Assays zu entwickeln, die eine quantitative Bestimmung der spezifischen CAR-NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität in diesem System ermöglichen. Da 3D-Kulturen die Physiologie und Komplexität von Organen sehr gut nachbilden, ermöglichen Organoide die Untersuchung potenzieller Therapieansätze mit einem zu *in vivo* Modellen vergleichbaren Therapieansprechen (Sachs *et al*, 2018; Liu *et al*, 2021). Darüber hinaus bietet der Einsatz



von Patienten-abgeleiteten Tumor-Organoiden die Möglichkeit, ein Ansprechen auf bestimmte Therapieansätze individuell vorherzusagen und damit die personalisierte Medizin entscheidend voranzutreiben (Pauli *et al*, 2017; Pickl & Ries, 2009; Sachs *et al*, 2018).

In dieser Arbeit wurde zunächst ein Protokoll entwickelt, das die Generierung von Organoiden aus dem murinen Brustepithel ermöglicht (siehe Abschnitt 4.1). Unter Verwendung des transgenen CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup>-Mausmodells konnten Organoid-Linien generiert werden, welche nach genetischer Modifikation das Zielantigen ErbB2 exprimieren und gleichzeitig neoplastische Treibermutationen tragen (siehe Abschnitte 4.2.1-4.2.3) (Rosigkeit *et al*, 2021). ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden zeigten physiologische Veränderungen, die auf eine neoplastische Transformation hinweisen (siehe Abschnitt 4.2.4). Die Etablierung eines Luciferase-basierten Reporterassays und einer mikroskopischen Zeitrafferanalyse ermöglichten es nachfolgend, die Zytotoxizität von CAR-NK-Zellen gegen die etablierten Mamma-Organoid-Linien zu evaluieren (siehe Abschnitt 4.3). Abschließend wurde das *Engraftment* der ErbB2-exprimierenden Mamma-Organoiden in immundefizienten und immunkompetenten Mäusen untersucht (siehe Abschnitte 4.4.1 und 4.4.2). Durch serielle *in vivo* Passagieren der Mamma-Organoiden konnten dabei sekundäre Tumor-Organoiden etabliert werden, die es nachfolgend ermöglichten, die Zytotoxizität von NK-92/5.28.z Zellen gegen heterogene Mammakarzinomzellen mit EMT- und CSC-Phänotyp zu analysieren (siehe Abschnitte 4.4.2 und 4.4.3).

## 5.1 Etablierung und Charakterisierung von Organoiden des murinen Brustepithels

Organoiden sind multizelluläre 3D-Kulturen, welche sich aus gewebespezifischen Zelltypen aufbauen und dabei eine organähnliche Kompartimentierung und Funktion aufweisen (Lancaster & Knoblich, 2014). Sie gehen aus pluripotenten oder gewebespezifischen adulten Stammzellen hervor, die sich unter geeigneten Kultivierungsbedingungen selbsterneuern oder aber in spezialisierte Zelltypen differenzieren und dadurch selbstorganisierte Zellverbände generieren (Clevers, 2016; Zakrzewski *et al*, 2019). Während die Ableitung von organspezifischen 3D-Kulturen aus pluripotenten Stammzellen zunächst eine *ex vivo* induzierte gerichtete Differenzierung erfordert, zeichnen sich gewebespezifische adulte Stammzellen bereits durch Multipotenz aus, sodass für die Etablierung von Organoiden lediglich eine zellphysiologische Umgebung reproduziert werden muss (Hofer & Lutolf, 2021). Im Gewebe sind adulte Stammzellen prinzipiell für die Erneuerung, Reorganisation und Reparatur verantwortlich. Um dabei den sich ändernden Anforderungen des Gewebes nachzukommen, interagieren und kommunizieren Stammzellen mit einer spezialisierten Nische, welche im Wesentlichen die Homöostase zwischen Proliferation und Differenzierung reguliert. Wichtige Bestandteile der Nische sind die Stammzellen selbst und deren Nachkommen, heterologe Zelltypen wie beispielsweise Fibroblasten und Komponenten der extrazellulären Matrix (engl., *Extracellular matrix*, ECM) (Chacón-Martínez *et al*,

2018). Über Zell-Zell-Kontakte, Zell-Matrix-Interaktionen, lösliche Moleküle sowie physikalische und chemische Stimuli erhalten Stammzellen verschiedenste Signale, welche den proliferationsinaktiven Zustand (Quieszenz) aufrechterhalten oder die symmetrische und asymmetrische Zellteilung induzieren (Redondo *et al*, 2017). Eine optimierte Rekonstruktion der Stammzellnische ist somit ein wichtiger Faktor für die erfolgreiche Etablierung von Organoiden.

### 5.1.1 Etablierung von murinen Mamma-Organoiden

Für die Entwicklung eines Protokolls zur Etablierung von Mamma-Organoiden sind grundlegende Erkenntnisse der zellulären Zusammensetzung endogener Brustdrüsen sowie des Aufbaus der Stammzellnische von Bedeutung. Die differenzierten Drüsengänge des Brustepithels bestehen aus einer luminalen, glandulären Epithelschicht, die von basalen myoepithelialen Zellen umschlossen wird (siehe Abb. 4.1). Diese werden von Komponenten der extrazellulären Matrix wie der Basalmembran und dem Bindegewebe sowie einem zellulären Stroma, darunter beispielsweise Fibroblasten, Adipozyten sowie Endothel- und Immunzellen, umgeben (Joshi *et al*, 2012). Im murinen Brustepithel können mindestens vier proliferationsaktive Zelltypen identifiziert werden, die verschiedene Vorläuferzellen und multipotente adulte Stammzellen einschließen (Chepko, 2005). Adulte Stammzellen des Brustepithels (engl., *Mammary stem cells*, MaSCs) können dabei vor allem im myoepithelialen Kompartiment lokalisiert werden (Shackleton *et al*, 2006). Ausgehend von einer rudimentären Epithelzellanlage wird die Etablierung intakter Brustdrüsen von zahlreichen Faktoren der Stammzellnische beeinflusst. Dabei spielen lösliche Moleküle wie Hormone und Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Die verschiedenen Signalmoleküle, die sowohl von MaSCs selbst aber auch von umliegenden Epithel- und Stromazellen sekretiert werden, aktivieren spezifische Signalwege und regulieren somit die Aktivität der teilungsaktiven Epithelzell-*Lineages*. Einen hohen Stellenwert in der Aufrechterhaltung der Selbsterneuerungsfähigkeit, der Regulation der Quieszenz und der Aktivierung von MaSCs übernehmen dabei beispielsweise der Wnt-, Hippo-, Delta-Notch- und *Hedgehog*-Signalweg (Fu *et al*, 2020; Incassati *et al*, 2010). Für die weitere Differenzierung in die verschiedenen Epithelzellpopulationen sind außerdem *Lineage*-spezifische Signale verantwortlich, wie beispielsweise der Transkriptionsfaktor ELF5 und die Expression spezifischer Notch-Rezeptoren, die ein luminales Schicksal festlegen (Edwards & Brennan, 2021; Fu *et al*, 2020). Die Ausbildung eines intakten Brustepithels erfordert somit eine intensive Zell-Zell-Kommunikation, die entweder über eine direkte Rezeptor-Liganden-Interaktion benachbarter Zellen oder aber durch die Sekretion von Mediatoren zur kontrollierten Aktivierung dieser Signalwege führt. Neben den zellulären Komponenten in der MaSCs-Nische spielt auch die ECM eine wichtige Rolle. Teilungsaktive Mamma-Epithelzellen exprimieren verschiedene Integrine, welche membrangebundene Rezeptoren auf Nachbarzellen oder Proteine der ECM wie Laminin, Collagen und Fibronectin binden können. Die Aktivierung von Integrinen führt zu dynamischen Interaktionen mit dem

Zytoskelett der Zelle und zur Rekrutierung spezifischer Moleküle, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. Integrine können dabei eine bidirektionale Signalweiterleitung (*Inside-out/Outside-in*) vermitteln. Über die Interaktion mit ECM-Komponenten regulieren sie beispielsweise die Proliferation und den Erhalt von Stammzellen, kontrollieren und definieren die Zellpolarität und tragen zur Differenzierung, Morphogenese und zum Erhalt der Epithelzell-Hierarchie bei (Ilić *et al*, 1998; Lambert *et al*, 2012; Lee & Streuli, 2014; Paavolainen & Peuhu, 2021; Romagnoli *et al*, 2019; Taddei *et al*, 2008).

Angesichts der Bedeutung von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen für den Erhalt und die kontrollierte Proliferation von Stammzellen werden für die Generierung von Organoiden verschiedenste Signale der endogenen Stammzellnische über spezialisierte Kultivierungsbedingungen reproduziert (Zhao *et al*, 2022). Die Kultivierung der Stammzellen erfolgt dabei in Hydrogelen, welche Komponenten der ECM und verschiedenste Signalmediatoren enthalten und über das Nährmedium mit spezifischen Wachstumsfaktoren ergänzt werden. MaSCs besitzen ein hohes regeneratives Potenzial, sodass eine einzelne Zelle in von Epithelzellen befreiten Brustfettpolstern (*Cleared fat pad transplantation*) der Maus die Fähigkeit besitzt, ein funktionales Brustepithel zu rekonstruieren (Kordon & Smith, 1998; Shackleton *et al*, 2006). Initiale Versuche zur Etablierung von murinen Mamma-Organoiden zielten daher auf eine durchflusszytometrische Anreicherung der EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>-Population ab, welche aus Zellsuspensionen des dissoziierten Brustfettpolsters gewonnen wurden. Die somit erhaltene Zellpopulation aus myoepithelialen Zellen und MaSCs wurde nachfolgend in dem Hydrogel Matrigel kultiviert. Matrigel ist eine basalmembranartige Matrix, die aus dem Sekret der murinen Sarkom-Zelllinie *Engelbreth-Holm-Swarm* gewonnen wird und ein komplexes Proteingemisch aus verschiedenen ECM-Proteinen, Wachstumsfaktoren und Signalmediatoren darstellt. Dabei setzen sich die ECM-Komponenten primär aus den Proteinen Laminin, Collagen IV, Entactin und Heparansulfat-Proteoglykan zusammen, welche auch von Zellen im endogenen Brustepithel produziert werden und zum Aufbau der Basalmembran beitragen (Aisenbrey & Murphy, 2020; Hughes *et al*, 2010; Raymond *et al*, 2012). Da myoepitheliale Zellen und MaSCs (EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>) verschiedene Integrine wie beispielsweise CD29, CD49a, -b, -c, -e und -f exprimieren, können durch die Kultivierung in Matrigel vielfältige Zell-Matrix-Interaktionen stattfinden. Darüber hinaus wurde das Nährmedium mit den Wachstumsfaktoren EGF und FGF sowie dem Rock-Inhibitor Y27632 versetzt. Gemeinsam mit der ECM können diese Komponenten Überlebenssignale vermitteln, dem programmierten Zelltod aufgrund eines Kontaktverlusts zu extrazellulären Matrixkomponenten (Anoikis) entgegenwirken und somit zum Erhalt der Stammzellen beitragen (Lambert *et al*, 2012; Wang *et al*, 2009). In diesen anfänglichen Zell-Matrigel-Kulturen konnten nach einigen Tagen Organoid-ähnliche Strukturen erkannt werden, allerdings wiesen diese eine eingeschränkte Proliferation auf, sodass eine weitere Expansion dieser Zellen nicht möglich war. Da der Anteil der EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>-Population in

Zellsuspensionen des Brustfettgewebes nur etwa 1-2 % betrug und es sich dabei um eine Mischpopulation aus myoepithelialen Zellen und MaSCs handelte, ist davon auszugehen, dass nur wenige Stammzellen in den abgeleiteten primären Matrigel-Kulturen vorhanden waren. Mögliche Ursachen für die geringe Effizienz dieses Ansatzes könnten daher die begrenzte Zellzahl der MaSCs oder eine fehlende Wechselwirkung mit Epithel- und Stromazellen sein.

Da sogenannte *Feeder*-Zellen bei der Kultivierung verschiedener Epithel- und Stammzellpopulationen zu einer verlängerten Proliferation und gesteigerten Expansion der Primärzellen beitragen konnten und teilweise auch basalmembranartige Hydrogele vollständig ersetzen können, wurde nachfolgend die Ko-Kultivierung von FACS-angereicherten EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>-Zellen mit bestrahlten 3T3-Fibroblasten geprüft (Llames *et al*, 2015). Über die Sekretion von Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Proteinen, die den Auf- und Abbau der ECM modulieren, aber auch durch die räumliche Nähe zu benachbarten Zellen, können Fibroblasten parakrine und juxtakrine Signale übertragen und somit den Erhalt von multipotenten Stammzellen in *ex vivo* Kulturen vermitteln (Hynds *et al*, 2018; Llames *et al*, 2015). Im endogenen Brustfettpolster wurde bereits gezeigt, dass Fibroblasten nicht nur das Überleben von Epithelzellen fördern, sondern auch die Morphogenese und Differenzierung unterstützen (Inman *et al*, 2015; Lühr *et al*, 2012). Die Beobachtung, dass angereicherte EpCAM<sup>low/med</sup>CD24<sup>low/med</sup>CD29<sup>high</sup>-Zellen in Ko-Kultur mit *Feeder*-Zellen proliferierten, doch nach anschließendem Transfer in Matrigel daraus abgeleitete 3D-Kulturen keine Expansion aufwiesen, deutet daher auf eine durch Fibroblasten induzierte Differenzierung und zelluläre Seneszenz der teilungsaktiven MaSCs hin. Da die Zelllinie 3T3 aus embryonalen Fibroblasten (engl., *Mouse embryonic fibroblasts*, MEFs) der *Outbred*-Mauslinie Swiss abgeleitet wurde, sich die molekularen Signaturen von Fibroblasten allerdings in verschiedenen Geweben unterscheiden, könnte ein von dem endogener Fibroblasten abweichendes Sekretom die mangelnde Fähigkeit der Selbsterneuerung der MaSCs bedingen (Gomes *et al*, 2021; Swonger *et al*, 2016). Weiterhin könnte die Aktivität der Stammzellen in diesem Ansatz durch die fehlende parakrine und kontaktabhängige Signalgebung weiterer Zelltypen eingeschränkt sein. Beispielsweise ist bekannt, dass MaSCs keinen Östrogen- und Progesteron-Rezeptor exprimieren, sodass eine entsprechende Signaltransduktion erst über die Sekretion verschiedener Mediatoren durch Hormonrezeptor-exprimierende lumenale Zellen vermittelt wird (Fu *et al*, 2020). In einem weiteren Ansatz wurden daher Zellsuspensionen des Brustfettpolsters eingesetzt, die ohne vorherige Epithelzell-Anreicherung in Matrigel kultiviert wurden. Dabei konnten in der Primärkultur bereits nach wenigen Tagen zahlreiche Organoide beobachtet werden, die mit fortschreitender Kultivierungsdauer weiter expandierten. Die durchflusszytometrische Analyse der Primärzellen zeigte eine Zunahme von ca. 2 % EpCAM<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>-Zellen nach Dissoziation des Brustfettpolsters auf etwa 38 % der Primärkultur (siehe Abb. 4.2 A). Daraus lässt sich schließen, dass die Kultivierung eines Zellgemischs aus dissoziiertem

Brustfettgewebe die physiologische Umgebung des Brustfettpolsters *in vitro* rekonstruieren kann und dadurch der Erhalt und die Proliferation von Epithelzellen gefördert wird. Weiterhin deutet dies auf relevante Wechselwirkungen zwischen den unterschiedlichen Epithelzell-*Lineages* und/oder Stromazellen hin, die in den vorherigen Ansätzen durch die Kultivierung individueller Zellpopulationen nicht ausgebildet werden konnten. Diese Vermutung wird auch durch die Beobachtungen der Zeitrafferaufnahmen bestärkt, in welchen Organoiden in Zellsuspensionen des Brustfettpolsters vor allem aus Zell-Clustern hervorgingen, während vollständig dissoziierte Einzelzellen über den Zeitraum des Experiments keine offensichtlichen 3D-Strukturen generierten (siehe Abb. 4.2 B).

Seriell Passagieren führte zu einer sukzessiven Anreicherung der Epithelzellen (siehe Abb. 4.3). Neben einer Expansion der Epithelzellen (EpCAM<sup>+</sup> und CD24<sup>+</sup>CD29<sup>+</sup>) wurde gleichzeitig eine Abnahme des Anteils an heterologen Zelltypen nachgewiesen, die sich durchflusszytometrisch über die *Lineage*-Population (CD31, CD45, Ter-119) oder die Expression von CD29, bei gleichzeitiger Abwesenheit von EpCAM und CD24, identifizieren ließen (siehe Abb. 4.1-4.3). Dabei zeigte sich bereits in der Primärkultur und der ersten Passage, dass der Anteil an Endothelzellen (CD31<sup>+</sup>), Leukozyten (CD45<sup>+</sup>) und Erythrozyten (Ter-119<sup>+</sup>) unter diesen Kultivierungsbedingungen stark abnahm. In den ersten Passagen wurde ein erhöhter Anteil an Lin<sup>-</sup>-Zellen (Lin<sup>-</sup>EpCAM<sup>-</sup>) ermittelt, die nicht auf einen epithelialen Ursprung zurückgeführt werden konnten und somit wahrscheinlich zu einem großen Anteil aus Fibroblasten und Adipozyten bestanden. Die selektive Abnahme dieser Zellen mit fortschreitender Kultivierungsdauer und Passagenanzahl lässt sich dadurch erklären, dass es sich hierbei um ausdifferenzierte Zellen handelt, die im Gegensatz zu adulten Stammzellen ein niedrigeres *Hayflick*-Limit aufweisen (Rubin, 2002). Wie auch Stromazellen besitzen differenzierte Epithelzellen ein limitiertes Teilungsvermögen. Die Beobachtung, dass Mamma-Organoide über einen langen Zeitraum mit gleichbleibender Effizienz kultiviert und expandiert werden konnten, deutet daher auf einen Erhalt der adulten Stammzellen hin, die sich durch symmetrische Zellteilung selbsterneuern, aber auch durch asymmetrische Teilung differenzierte Nachkommen hervorbrachten.

Damit wurde ein optimiertes Protokoll für die Generierung von Mamma-Organoide etabliert, bei welchem durch Kultivierung von dissoziierten Zellsuspensionen des Brustfettpolsters in Matrigel und seriellem Passagieren eine Selbstanreicherung von Epithelzellen stattfand, die sich in multizelluläre Verbände organisierten und sich für die Etablierung von Organoid-Langzeitkulturen eigneten.

### 5.1.2 Kompartimentierung und zelluläre Zusammensetzung der Mamma-Organoide

Nach Etablierung dieses effizienten und reproduzierbaren Protokolls zur Generierung von Mamma-Organoiden wurde untersucht, ob sich die damit etablierten 3D-Kulturen aus unterschiedlichen Epithelzell-*Lineages* zusammensetzen und eine für endogene Brustdrüsen typische Architektur

aufweisen. In 3D-Rekonstruktionen von mikroskopischen Schnittserien wurde bei Mamma-Organoiden ein zum endogenen Brustepithel vergleichbares Expressionsmuster der Zytokeratine K8+18 und K14 festgestellt (siehe Abb. 4.4). Dabei konnten K8+18-exprimierende Zellen vor allem in der dem Lumen zugewandten Epithelschicht festgestellt werden, während das Zytokeratin K14 in basalen Zellen beobachtet wurde. Wie endogene Brustdrüsen setzten sich die Mamma-Organoiden folglich aus einem mehrschichtigen Epithel zusammen, bei welchem luminale, glanduläre Zellen (K8+18<sup>+</sup>) die Drüsengänge auskleiden und dabei von myoepithelialen Zellen (K14<sup>+</sup>) umschlossen sind, die an die Basalmembran bzw. basalmembranartige Matrix angrenzen und somit im engen Kontakt mit Proteinen der ECM stehen (vgl. Abb. 4.1). Weiterhin wurde für ausgewählte Schnittebenen einer mikroskopischen Aufnahme eine Kolokalisations-Analyse der Zytokeratine durchgeführt, bei welcher in allen untersuchten Ebenen ein Pearson Korrelationskoeffizient (PCC) > 0 ermittelt wurde. Mit einem PCC von bis zu 0,834 besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine partielle Kolokalisation, die darauf hindeutet, dass einzelne Zellen innerhalb der Organoiden sowohl K8+18 als auch K14 exprimieren. Die vorübergehende Ko-Expression dieser Zytokeratine wurde zuvor in seltenen Fällen auch in adulten Brustdrüsen und postnatalen Epithelzellanlagen detektiert und deutet auf die Existenz von teilungsaktiven Stamm- oder Vorläuferzellen hin (Li *et al*, 2007; Sun *et al*, 2010).

Um die zelluläre Zusammensetzung der Organoid-Kulturen näher zu untersuchen, wurde eine durchflusszytometrische Analyse durchgeführt, bei der verschiedene Epithelzell-*Lineages* über das Expressionsmuster spezifischer Oberflächenrezeptoren identifiziert und/oder abgegrenzt wurden (siehe Abb. 4.1 und 4.5). Dabei wurde eine CD133<sup>-</sup>/Sca-1<sup>-low</sup>/CD24<sup>low</sup>/CD29<sup>+</sup>-Population detektiert, welche durch eine moderate EpCAM-Expression bei gleichzeitiger Abwesenheit der Oberflächenproteinen c-Kit und CD61 charakterisiert ist und die phänotypisch nicht weiter abgrenzbaren myoepithelialen Zellen und MaSCs umfasst (Sleeman *et al*, 2007; Visvader, 2009). Diese Population enthält zudem Mamma-Epithelzellen mit dem Expressionsmuster CD24<sup>low</sup>/CD29<sup>high</sup>, die als multipotente Stammzellen gelten und, wie durch *Cleared fat pad*-Transplantationen nachgewiesen, die Fähigkeit besitzen, vollständige Brustdrüsen zu rekonstruieren (Shackleton *et al*, 2006). Neben myoepithelialen Zellen und MaSCs konnte in dissoziierten Organoid-Suspensionen auch eine Population mit dem Expressionsmuster CD133<sup>-/+</sup>/Sca-1<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>/CD29<sup>+</sup> identifiziert werden, deren Phänotyp charakteristisch für luminale Mamma-Epithelzellen ist (Sleeman *et al*, 2007). Innerhalb dieser Population ließen sich Unterschiede im Expressionsniveau der Oberflächenproteine CD133 und CD61 nachweisen. Während luminale Progenitorzellen als CD61<sup>+</sup>/CD133<sup>-</sup> beschrieben werden, weisen duktale oder alveolare Epithelzellen einen CD61<sup>-</sup>/CD133<sup>+</sup>-Phänotyp auf (Asselin-Labat *et al*, 2007; Sleeman *et al*, 2007; Yang *et al*, 2016a). Die von Mamma-Organoiden abgeleiteten Einzelzellsuspensionen enthielten folglich sowohl luminale Vorläuferzellen als auch vollständig differenzierte Nachkommen.

Zusammengefasst zeigen die hier erhaltenen Daten, dass durch die zuvor beschriebenen Kultivierungsbedingungen Mamma-Organoiden generiert wurden, die durch die Anwesenheit adulter Stammzellen die Fähigkeit besitzen, unterschiedliche Vorläuferzellen und differenzierte Nachkommen hervorzubringen und sich dabei in eine für Brustdrüsen typische Kompartimentierung organisieren.

## 5.2 Etablierung von Mamma-Organoiden mit neoplastischen Treiber Mutationen

Um die Anti-Tumor-Aktivität von CAR-NK-Zellen in einem klinisch relevanten *in vitro* Brustkrebsmodell zu untersuchen, wurden Mamma-Organoiden generiert, welche die Zielstruktur ErbB2 exprimieren. Dieses besitzt eine konstitutiv aktive Rezeptorkonformation, sodass ErbB2-Moleküle bei hoher Expression Liganden-unabhängige Homodimere bilden und mitogene Signalwege aktivieren können (Wieduwilt & Moasser, 2008). Eine Überexpression von ErbB2 kann so zu einer unkontrollierten Zellteilung beitragen und hat damit transformierendes Potenzial (Neve *et al*, 2001). Für die Karzinogenese reicht eine einzelne Mutation allerdings nicht aus, sondern sie ist das Ergebnis einer sukzessiven Ansammlung von genetischen Veränderungen. Daher wurde für die Generierung von ErbB2-positiven Mamma-Organoiden das Mausmodell CC10-CreERT2Kras<sup>LSLG12Vgeo/WT</sup>Trp53<sup>fl/fl</sup> (CKP) verwendet, welches die Aktivierung von zusätzlichen Treiber Mutationen ermöglicht (Rosigkeit *et al*, 2021). In Zellen des CKP-Modells führt die Cre-vermittelte Rekombination zur Expression von onkogenem Kras<sup>G12V</sup> bei gleichzeitiger Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 (siehe Abb. 4.6). Die Mutation von p53 gilt als die häufigste genetische Veränderung bei Brustkrebs und vielen anderen Tumorentitäten (Myers *et al*, 2016). Im Gegensatz dazu liegt die Prävalenz von Kras-Mutationen beim Mammakarzinom bei lediglich 2 %. Jedoch bedingt Kras<sup>G12V</sup> als nachgeordnetes Signalmolekül von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) ebenso wie eine Überexpression von ErbB2 die Hyperaktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs (Huang *et al*, 2021; Kurokawa *et al*, 2000; Myers *et al*, 2016). Durch die genetische Modifikation von CKP-Organoiden können demzufolge relevante Mutationen und Signaltransduktionskaskaden des ErbB2-positiven Mammakarzinoms nachgebildet werden.

### 5.2.1 Genetische Modifikation von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden des Brustepithels

Die genetische Modifikation von CKP-Mamma-Organoiden (p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>) erforderte das Einbringen eines Vektors, der die Ko-Expression des humanen ErbB2-Rezeptors und der Cre-Rekombinase vermittelt. Da ErbB2 bei Überexpression als zelluläres Proto-Onkogen ein transformierendes Potenzial besitzt, wurden für den stabilen Gentransfer zunächst Vektorpartikel etabliert, welche durch einen Nagetier-spezifischen Tropismus das Gefährdungspotenzial für humane Zellen verringern. Dafür wurde ein von HIV abgeleiteter lentiviraler Vektor mit einem  $\gamma$ -retroviralen, ecotropen MLV-Glykoprotein pseudotypisiert (siehe Abb. 4.7). Im Gegensatz zu VSV-G- (engl., *Vesicular*



*stomatitis virus*) oder GALV- (engl., *Gibbon ape leukemia virus*) pseudotypisierten Vektorpartikeln, die sich an hochkonservierte Rezeptoren der Zelle anheften und dadurch ein breites Wirtsspektrum aufweisen, binden ecotrope MLV-Hüllproteine an den Cat-1-Rezeptor, dessen Expression auf Nagetier-Zellen beschränkt ist (Relander *et al*, 2002; Wang *et al*, 1991). In einem direkten Vergleich mit amphotropen VSV-G-pseudotypisierten Viruspartikeln konnte für den MLV-pseudotypisierten lentiviralen Vektor der ecotrope Tropismus bestätigt werden (siehe Abb. 4.8). Gegenüber VSV-G-pseudotypisierten Vektorpartikeln wurden dabei zwar geringere Titer ermittelt (siehe Abb. 4.7), allerdings waren diese ausreichend, um Mamma-Organoiden des CKP-Modells erfolgreich zu transduzieren (siehe Abb. 4.9).

Nach der Transduktion von CKP-Zellen mit dem lentiviralen ErbB2-Cre-Vektor (siehe Abb. 4.6) wurden genetisch modifizierte ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen über die Expression von ErbB2 durch eine Antikörperfärbung detektiert und durchflusszytometrisch angereichert (siehe Abb. 4.9). Die ektopische Expression der Transgene ErbB2 und Cre erfolgte unter Kontrolle des SFFV (engl., *Spleen focus-forming virus*)-Promotors, der in verschiedenen murinen Zelltypen einem *Silencing*-Effekt unterliegen kann (Herbst *et al*, 2012; Zhang *et al*, 2010). Daher wurde die Expression von ErbB2 in Organoid-Langzeitkulturen untersucht, in welchen auch nach etwa 70 Tagen eine stabile Expression des Transgens nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 4.9 B). Ein *Silencing* der SFFV-getriebenen Genexpression in Mamma-Epithelzellen des CKP-Modells konnte damit ausgeschlossen werden.

Um die Cre-vermittelte Rekombination in modifizierten CKP-Zellen zu bestätigen, wurden die konditional aktivierten Treibermutationen untersucht. Bei Cre/loxP handelt es sich um ein Rekombinationssystem, in welchem das Enzym Cre-Rekombinase spezifische DNA-Sequenzen, die sogenannten loxP-sites, schneidet und verbleibende loxP-Enden miteinander verknüpft. In Abhängigkeit von der loxP-Orientierung kann dabei die Exzision oder Inversion von flankierten DNA-Bereichen katalysiert werden (Tian & Zhou, 2021). Zellen des CKP-Modells tragen ein homozygoten Tp53<sup>F2-10</sup>-Allel im endogenen Locus (Jonkers *et al*, 2001). Dabei befinden sich LoxP-Sequenzen in den Introns 1 und 10, sodass nach Cre-vermittelter Rekombination die Exons 2 bis 10 deletiert werden. Die Exzision des von LoxP-Sequenzen flankierten Abschnitts konnte in genomischer DNA von modifizierten Mamma-Organoiden unter Verwendung spezifischer Primer mit Hilfe einer PCR und nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.10 A). Darüber hinaus wurde die Deletion des Tumorsuppressors p53 in einer durchflusszytometrischen und mikroskopischen Analyse auf Proteinebene bestätigt (siehe Abb. 4.10 B und C). Weiterhin wurde in Zellen des CKP-Modells die Aktivität von onkogenem Kras<sup>G12V</sup> untersucht. Während in unmodifizierten Zellen die Expression des heterozygoten LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Allels durch eine von LoxP-Sequenzen flankierte STOP-Kassette unterdrückt wird, vermittelt Cre die Deletion der STOP-Sequenz und induziert somit die Expression des konstitutiv

aktivierten Kras<sup>G12V</sup>. In CKP-Mäusen ist Kras<sup>G12V</sup> an das Reportergeren  $\beta$ -Geo gekoppelt, welches für ein Fusionsprodukt aus  $\beta$ -Galaktosidase und Neomycin-Phosphotransferase kodiert (Friedrich & Soriano, 1991; Guerra *et al*, 2003). Dadurch kann die Expression von onkogenem Kras indirekt über die Umsetzung von  $\beta$ -Galaktosidase Substraten nachgewiesen werden. In einer histochemischen Färbung und einer durchflusszytometrischen Analyse wurde die spezifische Expression aktiver  $\beta$ -Galaktosidase über die Hydrolyse von X-Gal und Fluorescein Di- $\beta$ -D-Galactopyranosid sowohl in fixierten als auch in lebenden ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen bestätigt (siehe Abb. 4.11 A und B). Da Kras ein Mediator des MAP-Kinase-Signalwegs ist, wurden in Immunoblot-Analysen die untergeordneten Kinasen c-RAF und ERK1/2 untersucht, welche bei ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen eine gesteigerte Phosphorylierung im Vergleich zu nicht modifizierten p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen zeigten (siehe Abb. 4. 11 D). Eine erhöhte Phosphorylierung von ERK1/2 ließ sich auch in einer durchflusszytometrischen Analyse nach einer intrazellulären Antikörperfärbung nachweisen (siehe Abb. 4. 11 E). Diese Untersuchungen bestätigten somit die stabile Expression von ErbB2, die konstitutive Aktivierung von Kras<sup>G12V</sup> und den Funktionsverlust von p53 in den genetisch modifizierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden zudem Mamma-Organotide generiert, welche zwar die gleichen neoplastischen Mutationen wie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen trugen, allerdings kein ErbB2 exprimierten und somit als geeignete Kontrolle für die Untersuchung der ErbB2-spezifischen Lyse durch CAR-NK-Zellen dienen konnten. Dafür wurden p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen unter Verwendung des Transferplasmids pRRLSIN.cPPT.PGK-Cre.WPRE lentiviral transduziert (siehe Abb. 4.22 A). Eine direkte durchflusszytometrische Anreicherung der modifizierten p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen war aufgrund eines fehlenden Oberflächenmarkers nicht möglich. Da Zellen des CKP-Modells nach der Cre-vermittelten Rekombination das Fusionsprotein  $\beta$ -Geo exprimieren, zeichnen sich transduzierte Zellen allerdings durch eine erhöhte Resistenz gegen das Neomycin-Analog G418 aus. Weiterhin besteht bei modifizierten Zellen ein p53-Funktionsverlust, welcher die Anreicherung von p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen mit Hilfe des MDM2-Inhibitors Nutlin-3a ermöglicht. MDM2 ist ein Regulator von p53, der in Abwesenheit von Stresssignalen den Abbau des Tumorsuppressors vermittelt (Haupt *et al*, 1997). Die Inhibition von MDM2 resultiert in einer Ansammlung intakter p53-Moleküle, die nachfolgend den Zellzyklus arretieren und/oder die Apoptose einleiten (Vassilev *et al*, 2004). Zellen, die einen Defekt des p53-Proteins aufweisen, haben daher eine geringere Sensitivität gegenüber Nutlin-3a (Sachs *et al*, 2019). Entsprechend erlaubte die Selektion mit G418 und Nutlin-3a die Anreicherung von p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen. In einer quantitativen mikroskopischen Immunfluoreszenzanalyse zeigte der so generierte Zellpool ein mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen vergleichbar geringes p53-Signal (siehe Abb. 22 F). Nach einer X-Gal-Färbung konnte in p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen außerdem ein blauer Niederschlag beobachtet werden, der als Nachweis für aktive  $\beta$ -Galaktosidase und als Indikator einer Kras<sup>G12V</sup> Expression diente

(siehe Abb. 22 C). In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde in  $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen wie auch in  $ErbB2/p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Organoiden eine gegenüber  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen erhöhte Aktivität des MAP-Kinase-Signalwegs ermittelt, angezeigt durch eine starke Zunahme an phosphoryliertem p-ERK1/2 (siehe Abb. 4.9 B). Damit konnte auch in  $p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen ein Funktionsverlust von p53 und eine gleichzeitige Aktivierung von onkogenem Kras nachgewiesen werden.

## 5.2.2 Phänotypische und molekulare Charakterisierung genetisch modifizierter Mamma-Organoiden

Bei den aktivierten Transgenen handelt es sich um neoplastische Treibermutationen. Um Hinweise auf eine mögliche Transformation der  $ErbB2/p53^{-/-}/Kras^{G12V}$ -Zellen zu erhalten, wurden für entartete Tumorzellen charakteristische zellphysiologische Eigenschaften untersucht. Unter allen genetischen Veränderungen, die an der Onkogenese und Progression von Krebserkrankungen beteiligt sind, ist eine Mutation im p53-Gen die Häufigste (Baugh *et al*, 2018). Der Transkriptionsfaktor p53 kann die Expression verschiedenster Gene induzieren und leistet dabei einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung der genomischen Integrität. In gestressten und geschädigten Zellen reguliert p53 die Überwachung und Arretierung des Zellzyklus, unterstützt DNA-Reparaturprozesse und kann den programmierten Zelltod einleiten (Feroz & Sheikh, 2020). Ein Defekt des p53-Gens hat folglich tumorfördernde Eigenschaften und ist mit genomischer Instabilität von betroffenen Zellen assoziiert (Donehower, 1996; Eischen, 2016; Malkin, 2011). Auch einer Überexpression des ErbB2-Rezeptors werden tumorfördernde Eigenschaften zugeschrieben. Die Homodimerisierung von ErbB2 oder Heterodimerisierung mit anderen Mitgliedern der ErbB-Rezeptor-Familie führt zur Phosphorylierung der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne, die nachfolgend als Bindestelle für eine Vielzahl von Adaptorproteinen zur Verfügung steht (Wieduwilt & Moasser, 2008). Dadurch können diverse Signaltransduktionskaskaden, wie beispielsweise der MAP-Kinase-, PI3-Kinase- und JAK-STAT-Signalweg induziert werden, welche die Proliferation, Migration, Differenzierung und das Überleben von Zellen fördern (Wieduwilt & Moasser, 2008). Da ErbB2 in der Lage ist, Liganden-unabhängige Dimere zu bilden, führt die Überexpression zu einer konstitutiven Aktivierung des Rezeptors und der nachgeordneten Signalwege. Neben mitogener Aktivität fördert ErbB2 bei Krebserkrankungen die Fähigkeit zur Metastasierung und vermittelt Krebszellen eine erhöhte Resistenz gegenüber diversen therapeutischen Ansätzen, weshalb die Überexpression von ErbB2 generell mit einer schlechteren klinischen Prognose für Patienten assoziiert ist (Yu & Hung, 2000). Als nachgeordneter Mediator von ErbB2 und Signaltransduktor innerhalb des MAP-Kinase-Wegs fördert auch die kleine GTPase Kras die Proliferation von Zellen. Die Aktivierung von Kras erfolgt nach Bindung von Guanosintriphosphat (GTP) und führt zu einer in Serie geschalteten Phosphorylierungskaskade von Kinasen, die letztendlich einen Einfluss auf

die Genexpression ausüben (siehe Abb. 4.11 C). Das Onkogen Kras<sup>G12V</sup> entsteht durch eine Missense-Mutation in Codon 12, die einen Aminosäureaustausch von Glycin (G) zu Valin (V) zur Folge hat und die Hydrolyse von GTP durch Kras beeinträchtigt. Dabei manifestiert sich die Mutation in einer Akkumulation aktiver Kras-Moleküle und einer aberranten Aktivität nachgeordneter Signalwege (Smith *et al*, 2013). Die Überexpression von ErbB2 und konstitutive Aktivierung von Kras führt zu einer gesteigerten Proliferation, die bei gleichzeitigem Funktionsverlust von p53 durch eine mangelnde Überwachung des Zellzyklus und ausbleibenden Reparatur von DNA-Schäden zu einer unkontrollierten Zellteilung und der sukzessiven Ansammlung weiterer Mutationen beitragen kann. Dass eine anhaltende Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs durch onkogenes Kras in Kombination mit einem p53-Defekt für die neoplastische Transformation von betroffenen Zellen ausreicht, konnte in zahlreichen Mausmodellen gezeigt werden, in welchen sich nach konditionaler Aktivierung der Treibermutationen autochthone Tumoren entwickelten (Nakahata *et al*, 2022; O'Dell *et al*, 2012; Rosigkeit *et al*, 2021).

Um einen potenziell tumorfördernden Einfluss der *ex vivo* induzierten Mutationen in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen festzustellen, wurden die modifizierten Zellen auf phänotypische und molekulare Veränderungen hin untersucht. Dabei wurden morphologische Unterschiede zwischen p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden und davon abgeleiteten 2D-Kulturen festgestellt (siehe Abb. 4. 12). In 2D-Kulturen zeigten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen im Vergleich zur unmodifizierten Ausgangslinie stark vergrößerte und unregelmäßige Nuklei und Zellkörper (siehe Abb. 4. 12 B). Pathologisch gelten vergrößerte und pleomorphe Zellkerne als ein allgemeiner Indikator für entartete Zellen (Dey, 2010; Fischer, 2020). Die Ursache der vergrößerten Nuklei in Tumorzellen ist bisher nicht vollständig geklärt, allerdings gibt es Hinweise auf Aneuploidie als einen möglichen Einflussfaktor (Fischer, 2020; Smith *et al*, 2018). Ein weiteres Malignitätskriterium ist die Mehrkernigkeit, die in der Regel nicht in gesunden Epithelzellen auftritt, allerdings in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen beobachtet wurde (siehe Abb. 4.12 B) (Parekh *et al*, 2018). Auch in 3D-Kulturen wurden morphologische Unterschiede zwischen modifizierten und unmodifizierten Organoiden festgestellt (siehe Abb. 4.12 C). Unter gleichen Kultivierungsbedingungen wiesen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden ein größeres Volumen und einen stärkeren Verzweigungsgrad auf. Unterschiede in der Morphologie deuten auf zellphysiologische und genetische Veränderungen hin, wie sie auch in anderen Organoid-Kulturen beobachtet wurden, wie beispielsweise in einer vergleichenden Analyse von kolorektalen Organoiden, die aus gesundem und Tumorgewebe der gleichen Patienten generiert wurden (Kashfi *et al*, 2018). Weiterhin wurden in verschiedenen humanen Mamma-Organoid-Kulturen eine für die Tumor-Subklassifizierung charakteristische Morphologie und Verteilung der Epithelzell-*Lineages* beobachtet (Rosenbluth *et al*, 2020; Sachs *et al*, 2018). Eine mögliche Ursache der morphologischen Unterschiede in p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoid-Kulturen könnten daher invasiv wachsende

ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen sein, welche die organotypische Kompartimentierung, wie sie für p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoide beobachtet wurde (vgl. Abb. 4.4) durchbrechen. Dies könnte die Ausbildung atypischer, mehrschichtiger Epithelien und eine veränderte zelluläre Zusammensetzung der Organoide bedingen. Größenunterschiede in den Organoid-Kulturen könnten außerdem durch eine gesteigerte Zellteilung verursacht worden sein, die bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch eine erhöhte Expression des Proliferationsmarkes Ki67 angezeigt wurde (siehe Abb. 4. 13 A und B).

Bei einer Analyse des Zellzyklus wurde neben einem gesteigerten Anteil an Ki67-positiven ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen außerdem ein erhöhter Anteil an Zellen in der S-Phase beobachtet (siehe Abb. 4. 13 B). Dies kann unter anderem durch die konstitutive Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs erklärt werden, welcher die Progression des Zellzyklus positiv reguliert. Die Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTKs) und Komponenten des MAP-Kinase-Wegs trägt dabei zur Expression von Cyclin D bei und reguliert gleichzeitig die Assoziation mit korrespondierenden Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK), die den Übergang von der G1- in die S-Phase fördern (Sherr & Bartek, 2017; Wilkinson & Millar, 2000). Unter physiologischen Bedingungen kann p53 durch die transkriptionelle Aktivierung von p21 zu einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase beitragen (Chen, 2016; Wilkinson & Millar, 2000). Da in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen ein p53-Defekt vorliegt, kann der mitogenen Aktivität des MAP-Kinase-Wegs allerdings nicht entgegengewirkt werden, was weiter zu einer verstärkten Zellteilung und Ansammlung von Zellen in der S-Phase des Zellzyklus beiträgt. Neben einer gesteigerten Proliferation und der Resistenz gegenüber wachstumshemmenden Signalen ist die reproduktive Autonomie ein weiteres Kennzeichen von Tumorzellen (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011, 2000). Eine solche Unabhängigkeit zeigte sich in einer unveränderten Phasenverteilung der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen im Zellzyklus nach Entzug von Wachstumsfaktoren (siehe Abb. 4. 13 B). Im Gegensatz dazu wurde bei p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen, die ohne Wachstumsfaktoren kultiviert wurden, eine zunehmende Zahl an Zellen in G0- und eine Abnahme an Zellen in der G2/M-Phase beobachtet. Organoide haben mit fortschreitender Tumorphase geringere Anforderungen an Wachstumsfaktoren der Nische (Fujii *et al*, 2016). Entsprechend deutet ein gleichbleibender Zellzyklus nach Entzug der Wachstumsfaktoren auf eine neoplastische Transformation der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen hin.

Da die maligne Transformation und fortschreitende Karzinogenese mit einer Ansammlung weiterer Mutationen assoziiert ist, wurden aberrante DNA-Reparatur und chromosomale Instabilität über die Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) untersucht (siehe Abb. 4.14). DNA-Doppelstrangbrüche werden über die Phosphorylierung des H2AX-Histons ( $\gamma$ -H2AX) markiert und können immunhistologisch als Focus veranschaulicht werden. In gesunden Zellen werden durch die Phosphorylierung des Histons verschiedene DNA-Reparaturmechanismen aktiviert, sodass  $\gamma$ -H2AX-Foci nach erfolgreicher Reparatur der DNA-DSBs nicht mehr sichtbar sind (Mariotti *et al*, 2013). In einer

mikroskopischen Analyse wurden in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen im Gegensatz zu p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen bis zu 100  $\gamma$ -H2AX-Foci pro Zelle detektiert, die somit eine stark erhöhte Anzahl an DNA-Doppelstrangbrüchen anzeigten (siehe Abb. 4.14). Dies deutet auf eine Akkumulation von Mutationen hin, welche durch unzureichende DNA-Reparatur im Genom der Zelle fixiert werden.

Zusammenfassend wurden in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen zahlreiche phänotypische und molekulare Veränderungen nachgewiesen, die generell mit Krebszellen in Verbindung gebracht werden. Dabei zeigten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen eine veränderte Morphologie, eine verstärkte Proliferation, Anzeichen einer autonomen Reproduktion und einer genomischen Instabilität. Nachfolgend wurde die neoplastische Transformation der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen zudem durch ihr *Engraftment* in NSG-Mäusen und die Bildung von Tumoren bestätigt (siehe Abschnitt 5.4).

### 5.3 Analyse der Aktivität von CAR-NK-Zellen im ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoid-Modell des Mammakarzinoms

Nach Etablierung sowie phänotypischer und molekularer Charakterisierung der murinen Organoid-Linien, wurden diese als innovatives *in vitro* Modell zur Analyse der Anti-Tumor-Aktivität von NK-92 Zellen gegen das ErbB2-positive Mammakarzinom eingesetzt. Der Fokus lag dabei auf der Untersuchung der CAR-exprimierenden Zelllinie NK-92/5.28.z, die sich durch ihre Spezifität für das tumorassoziierte Antigen ErbB2 auszeichnet und derzeit in einer klinischen Phase-I-Studie in Patienten mit rezidivierendem ErbB2-positivem Glioblastom evaluiert wird. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits gezeigt, dass NK-92/5.28.z eine effektive Anti-Tumor-Aktivität gegen verschiedene, in 2D-Kultur wachsende, ErbB2-positive Brustkrebszelllinien aufweisen (Schönfeld *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2017). Dabei bewirkten NK-92/5.28.z Zellen eine spezifische Lyse von ErbB2-exprimierenden MDA-MB453 Zellen, während Antigen-negative MDA-MB468 Zellen erwartungsgemäß nicht abgetötet wurden (siehe Abb. 4.16 A). NK-92 Zellen weisen auch eine CAR-unabhängige natürliche Zytotoxizität gegenüber verschiedenen Zielzellen wie beispielsweise K562 auf, welche durch die *Missing-self*- oder *Induced-self*-Hypothese erklärt werden kann und zur Aktivierung der Effektorzellen beiträgt (siehe Abb. 4.16 A). Etablierte Zelllinien weisen mit fortschreitender Kultivierungsdauer eine eingeschränkte Komplexität auf und ihre molekularen Eigenschaften können sich stark von denen des ursprünglichen Tumors unterscheiden. Im Gegensatz hierzu bestehen Organoide aus heterogenen Zelltypen (siehe Abb. 4. 5), die sich in multizellulären Verbänden mit organotypischer Kompartimentierung organisieren (siehe Abb. 4. 4) und dabei die genetische Heterogenität von Tumoren effizient reflektieren und konservieren (Dijkstra *et al*, 2018; Driehuis *et al*, 2019; Sachs *et al*, 2018). Organoide zeigen nicht nur ein ähnliches Therapieansprechen wie PDX-Modelle, sondern auch wie Patienten (Driehuis *et al*, 2019; Durinikova *et*

al, 2021; Kretzschmar, 2021; Sachs *et al*, 2018). Daher erscheinen sie auch besser als etablierte Zelllinien dafür geeignet, die Anti-Tumor-Aktivität zielgerichteter Immunzellen wie NK-92/5.28.z zu untersuchen.

### 5.3.1 Etablierung von Zytotoxizitätsassays zur Untersuchung der NK-Zell-vermittelten Lyse von 3D-Kulturen

Um die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber 3D-Kulturen zu untersuchen, wurden zunächst geeignete Assays etabliert, in denen die Lyse der Mamma-Organoiden quantifiziert werden konnte. Klassische FACS-basierte Untersuchungen erfordern eine Dissoziation der zu analysierenden Zellen und sind daher für die Studien mit 3D-Kulturen wenig geeignet. Um eine Quantifizierung lebender und abgetöteter Zielzellen ohne vorherige Dissoziation zu ermöglichen, wurden sfGFP- und Luciferase-exprimierende Organoid-Linien generiert, die nachfolgend in mikroskopischen Zeitraffer-Experimenten und Luciferase-Reporterassays eingesetzt wurden. Nach der lentiviralen Transduktion mit einem sfGFP/luc2-Vektor wurden erfolgreich transduzierter Zellen durchflusszytometrisch angereichert und zeigten eine stabile Expression von sfGFP (siehe Abb. 4.15 B und C) und funktionaler Luciferase (siehe Abb. 4. 15 D). Um erste Hinweise auf das Ausmaß der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegen p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen zu erhalten, wurden zunächst parentale oder CAR-exprimierende NK-92 Zellen und dissoziierte Organoiden ko-kultiviert und der Anteil der lysierten Zielzellen wurde in einem vereinfachten durchflusszytometrischen bestimmt (siehe Abb. 4. 16 B). Dabei erhaltene Daten wurden nachfolgend für den direkten Vergleich mit einem mikroskopischen Zeitraffer-Experiment herangezogen. Die Etablierung des mikroskopischen Zytotoxizitätsassays erfolgte ebenfalls mit dissoziierten Organoiden. Mit Hilfe eines Caspase-3/7-*Biotrackers* wurden dabei apoptotische Zellen in Echtzeit visualisiert. Gleichzeitig wurde die Lyse von sfGFP-exprimierenden Zielzellen durch die Quantifizierung des Reportergens bestimmt. Bei einer 4-stündigen Ko-Kultivierung wurde die CAR-NK-Zell-vermittelte Lyse von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen anhand der sukzessiven Abnahme des sfGFP-Signals verfolgt. Im Vergleich zur durchflusszytometrischen Analyse, in welcher die Quantifizierung von abgetöteten Zielzellen durch eine Färbung mit Propidiumiodid erfolgte, wurde dabei eine leicht erhöhte Lyse der Zielzellen ermittelt. In einem unabhängigen FACS-Experiment wurde beobachtet, dass in Caspase-3/7-*Biotracker*-positiven Zellen bereits kein sfGFP mehr detektiert werden konnte, die Zellen sich allerdings noch nicht durch PI anfärben ließen (Daten nicht gezeigt). Die simultane Visualisierung der Caspase-3/7-Aktivität mit Hilfe des *Biotracker*s und Auslöschung des sfGFP-Signals in Zielzellen konnte auch in repräsentativen Bildern von Zeitrafferuntersuchung bestätigt werden (siehe Abb. 4.16 D und 4.17 C). Aus diesen Beobachtungen ist zu schließen, dass sfGFP bereits in pro-apoptotischen Zellen nicht mehr nachweisbar ist, während eine Anfärbung mit PI die Permeabilisierung der Zellmembran erfordert und dadurch eher für die Detektion von Zellen mit fortgeschrittener Apoptose geeignet ist



(Wlodkowic *et al*, 2011). Durch die Quantifizierung des sfGFP-Signals konnte folglich ein zuverlässiges mikroskopisches Zeitraffer-Assay etabliert werden, das sich durch eine höhere Sensitivität gegenüber dem klassischen FACS-basierten Zytotoxizitätsassay auszeichnet und gleichzeitig kinetische Untersuchungen ermöglicht.

Weiterhin wurde ein Luciferase-Reporterassay etabliert, in welchem die Lyse von Zielzellen über die Quantifizierung der Lumineszenz bestimmt wurde (siehe Abb. 4.18 A). Für die Validierung dieses Zytotoxizitätsassays wurden K562-Zellen eingesetzt, die nach lentiviraler Transduktion und der durchflusszytometrischen Zellanreicherung eine stabile Expression der Reportergene sfGFP und Luciferase aufwiesen (Daten nicht gezeigt). In einer Zellverdünnungsreihe wurde ein direkter linearer Zusammenhang zwischen Zellzahl und Lumineszenz-Signal nachgewiesen, sodass die NK-Zell-vermittelte Lyse von Zielzellen durch eine abnehmende Luciferase-Aktivität quantifiziert werden konnte (siehe Abb. 4.18 B). Im direkten Vergleich zu einem durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassay wurde auch hier eine erhöhte Lyse der Zielzellen festgestellt (siehe Abb. 4.18 C). Wie die mikroskopische Zeitrafferanalyse zeichnet sich demnach auch das Luciferase-Reporterassay durch eine höhere Sensitivität aus.

### 5.3.2 NK-Zell-Aktivität gegen dissoziierte Mamma-Organoid

Erste Hinweise zur Sensitivität der generierten  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ - und  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Linien gegenüber NK-92 Zellen ergaben sich aus vereinfachte Zytotoxizitätsstudien mit dissoziierten Organoiden. Bei einer 4-stündigen Ko-Kultivierung zeigten NK-92/5.28.z eine zielgerichtete Zytotoxizität gegen  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen, die sowohl in einer durchflusszytometrischen Untersuchung als auch in einem mikroskopischen Zeitraffer-Experiment nachgewiesen wurde (siehe Abb. 4. 16 B, C und D). Eine Lyse durch parentale NK-92 Zellen konnte hingegen nicht beobachtet werden, sodass das Abtöten der  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen eindeutig auf die Antigenspezifität der NK-92/5.28.z Zellen zurückzuführen ist. Entsprechend wiesen  $ErbB2$ -negative  $p53^{fl/fl}/LSL-Kras^{G12V}$ -Zellen bei einer 4-stündigen Ko-Kultivierung keine Sensitivität gegenüber NK-92/5.28.z Zellen auf (siehe Abb. 4. 16 B und D).

Weiterhin wurde eine spezifische Aktivierung und Degranulation von NK-92/5.28.z Zellen nach Kontakt mit  $ErbB2/p53^{-}/Kras^{G12V}$ -Zellen durch Analyse der CD107a-Expression und Polarisierung der lytischen Granula nachgewiesen (siehe Abb. 4. 17 B und C). Bei der Exozytose lytischer Granula handelt es sich um einen kontaktabhängigen Mechanismus zur Eliminierung von Zielzellen (siehe Abb. 4. 17 A). Die Konjugation von Ziel- und NK-Zelle führt zur Formation der immunologischen Synapse (IS), die bei dominierender Signaltransduktion über aktivierende Rezeptoren in eine lytische IS übergeht. Die Phosphorylierung von Immunrezeptor Tyrosin-basierten Aktivierungsmotiven (ITAMs) innerhalb

spezifischer NK-Zell-Rezeptorkomplexe induziert eine Reorganisation des Zytoskeletts, die Polarisierung des MTOC (engl., *Microtubule organizing center*) in Richtung der IS und den gerichteten Transport der lytischen Granula entlang der Mikrotubuli (Orange, 2008). Anschließend erfolgt die Degranulation, während der die lytischen Granula mit der Plasmamembran fusionieren und Effektormoleküle wie Perforin oder Granzyme in den synaptischen Spalt entlassen werden. Durch die Degranulation gelangen die in der Membran von zytotoxischen Granula befindlichen CD107a Moleküle an die Oberfläche der NK-Zelle und können dort detektiert werden (Cohnen *et al*, 2013). In einer durchflusszytometrischen Analyse wurde lediglich bei Ko-Kultur von NK-92/5.28.z und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen oder nach Stimulation der NK-Zellen mit PMA und Ionomycin ein gesteigerter Anteil an CD107a-positiven Effektorzellen nachgewiesen (siehe Abb. 4.17 B). Die Ko-Kultivierung von NK-92/5.28.z und p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen oder parentalen NK-92 und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen führte hingegen nicht zu einer Steigerung der CD107a Expression.

Da in NK-Zellen erst nach Ausbildung der lytischen IS eine Polarisierung des MTOC erfolgt, kann dies als direkter Nachweis für die Aktivierung von NK-Zellen dienen. Dabei wurde gezeigt, dass die Aktivität von Kinasen der Src-Familie und eine LFA-1-Integrin-vermittelte Signaltransduktion eine zwingende Voraussetzung für die Konvergenz und gerichtete Exozytose von lytischen Granula ist (Hsu *et al*, 2016; James *et al*, 2013). Bei Konjugation von parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 und p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen oder parentalen NK-92 und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen zeigte sich eine zufällige, ungerichtete Verteilung der lytischen Granula innerhalb der Effektorzellen (siehe Abb. 4.17 C). Dies deutet darauf hin, dass zwar eine Interaktion über Adhäsionsmoleküle wie LFA-1 stattfinden kann, die für eine gerichtete Repolarisation der zytotoxischen Granula notwendigen aktivierenden Signale allerdings fehlen. Hingegen wurde eine deutliche Polarisierung der mit *LysoTracker* markierten Granula bei Kontakten zwischen NK-92/5.28.z und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen beobachtet (siehe Abb. 4.17 C). Die gezielte Polarisierung der Granula nach der Konjugation mit ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen kann dabei eindeutig auf die Aktivierung der NK-92/5.28.z Zellen über das ErbB2-spezifische CAR-Molekül zurückgeführt werden. Dies enthält eine intrazelluläre CD3ζ-Kette mit drei ITAMs, welche nach der Rezeptorligation von Src-Kinasen phosphoryliert werden und somit eine gezielte Konvergenz der lytischen Granula vermitteln. Weiterhin kann die in dem CAR-Molekül enthaltene kostimulatorische CD28-Domäne den gerichteten Transport der Granula fördern (Mentlik *et al*, 2010). Nach CAR-NK-Zell-Kontakt wurde zudem die proteolytische Spaltung des DEVD-Fluoreszenzfarbstoffs NucView-Caspase-Biotracker nachgewiesen, was die Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen bestätigt. Dies lässt sich auf Effektormoleküle wie GzmB zurückführen, die nach Exozytose der lytischen Granula und Perforin-vermittelter Permeabilisierung der Zellmembran eine Caspase-Kaskade in den Zielzellen einleiten (Krzewski & Coligan, 2012; Prager *et al*, 2019). Diese Daten zeigen, dass

ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen sensitiv gegenüber ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z Zellen sind. Die vollständige Aktivierung der CAR-NK-Zellen und damit einhergehende gerichtete Konvergenz der lytischen Granula erfordert dabei eine antigenspezifische Interaktion des CAR-Moleküls mit dem ErbB2-Rezeptor auf den Zielzellen.

### 5.3.3 NK-Zell-vermittelte Zytotoxizität gegen intakte Mamma-Organoiden in 3D-Kultur

Nachdem die antigenabhängige Aktivierung von NK-92/5.28.z durch ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen und dadurch ausgelöste spezifische Lyse der ErbB2-positiven Mamma-Epithelzellen in 2D-Kulturen bestätigt worden war, erfolgten Analysen zur Bestimmung der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität gegenüber 3D-Kulturen. Zunächst wurde ein direkter Vergleich der Lyseaktivität von NK-Zellen gegen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen in 2D- und 3D-Kultur durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass dissoziierte ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen in einer 4-stündigen Ko-Kultur mit NK-92/5.28.z Zellen effizienter lysiert wurden als intakte Organoiden (siehe Abb. 4.19). Da sowohl Organoiden als auch die davon abgeleiteten Einzelzellsuspensionen die gleiche Zusammensetzung an Epithelzell-*Lineages* aufweisen (siehe Abb. 4.5), kann die verminderte Lyseaktivität von NK-Zellen gegenüber Organoiden vor allem auf die komplexere Architektur der 3D-Kulturen zurückgeführt werden. Auch in anderen 3D-Modellen wurde ein im Vergleich zu Monolayer-Kulturen verändertes Therapieansprechen beschrieben (Imamura *et al*, 2015; Karlsson *et al*, 2012; Vinci *et al*, 2012). Beispielsweise zeigten Spheroide verschiedener Brustkrebszelllinien im Vergleich zu 2D-Kulturen eine verminderte Sensitivität gegenüber verschiedenen Zytostatika, die sich teilweise auf eine erhöhte Apoptose-Resistenz zurückführen ließ (Imamura *et al*, 2015). Interessanterweise wurde die erhöhte Resistenz nur bei stark verdichteten Spheroid-Verbänden beobachtet, was auf eine protektive interzelluläre Wechselwirkung der Tumorzellen hindeutet (Imamura *et al*, 2015). In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass kryokonservierte NK-Zellen gegenüber frisch isolierten Effektorzellen bezüglich ihrer Migration beeinträchtigt sind. Dabei behielten die kryokonservierten NK-Zellen zwar gleichbleibende Zytotoxizitätseigenschaften gegen 2D-Kulturen, allerdings zeigte sich eine verringerte Beweglichkeit im Vergleich zu frisch isolierten NK-Zellen und dadurch eine verminderte Zytotoxizität gegen Zielzellen in 3D-Assays (Fitzgerald *et al*, 2020; Mark *et al*, 2020). Diese Erkenntnisse weisen darauf hin, dass Organoiden und andere 3D-basierte Modellsysteme eine im Vergleich zu herkömmlichen 2D-Kulturen verbesserte pathophysiologische Nachbildung solider Tumorerkrankungen ermöglichen und sich besser eignen, um die Migration und Infiltration von Immunzellen zu untersuchen. Mit dem hier von Mamma-Organoiden abgeleiteten *in vitro* Brustkrebsmodell können demzufolge zusätzliche Informationen gewonnen werden, die in 2D-Kulturen nicht oder nur eingeschränkt zugänglich sind.

Da die Zytotoxizität der NK-Zellen gegenüber Mamma-Organoiden in einer 4-stündigen Ko-Kultivierung im Vergleich zu Monolayer-Kulturen reduziert war und auch bei einem hohen E/T-Verhältnis von 10:1 die Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zielzellen durch NK-92/5.28.z nur durchschnittlich 35,7 % ± 9,0 % betrug (siehe Abb. 4. 19), wurden nachfolgend Langzeit-Zytotoxizitätsstudien durchgeführt. Entgegen den Erwartungen wurde bei einer 24-stündigen Ko-Kultivierung jedoch nicht nur eine Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>/luc2-sfGFP-Zellen durch NK-92/5.28.z beobachtet, sondern auch eine erhöhte ErbB2-unabhängige, natürliche Zytotoxizität parentaler NK-92 Zellen (siehe Abb. 4. 20 A und B). In vorangegangenen Experimenten mit dissoziierten Organoiden wurde gezeigt, dass die Aktivierung der CAR-Effektorzellen auf die Interaktion des CAR-Moleküls mit dem ErbB2-Rezeptor auf Zielzellen zurückzuführen ist (siehe Abb. 4.16 und 4.17). Diese spezifische und kontaktabhängige Aktivierung über den CAR blieb dabei auch bei 24-stündiger Ko-Kultivierung bestehen, bei welcher ein im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle gesteigerter Anteil CD107a-positiver NK-92/5.28.z Zellen lediglich nach Kontakt mit dissoziierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen festgestellt wurde (siehe Abb. 4.20 C). Insgesamt wurde allerdings eine erhöhte basale Degranulation im Vergleich zu einer nur 4-stündigen Inkubation beobachtet, die bei parentalen NK-Zellen durchschnittlich bei 14,3 % ± 6,5 % und bei NK-92/5.28.z bei 18,2 % ± 3,9 % lag. Ein vergleichbarer Anteil CD107a-positiver Effektorzellen wurde auch in Ko-Kulturen von ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und NK-92-Zellen sowie parentalen oder CAR-exprimierenden NK-Zellen und unmodifizierten Mamma-Organoiden beobachtet, sodass die natürliche Zytotoxizität nicht auf eine kontaktabhängige Exozytose von zytotoxischen Granula zurückgeführt werden kann.

Neben der Exozytose lytischer Granula exprimieren NK-Zellen auch Todesliganden wie beispielsweise FasL, welche nach der Interaktion mit entsprechenden Rezeptoren die Ausbildung des DISC (engl., *Death-inducing signaling complex*) und die Aktivierung von Caspasen in Zielzellen vermitteln (Prager & Watzl, 2019). Nach der Ko-Kultivierung von NK-Zellen mit p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>- oder ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen wurde eine erhöhte Menge an FasL auf der Oberfläche der Effektorzellen nachgewiesen (siehe Abb. 4. 21). Entsprechend könnte eine Todesrezeptor-vermittelte Apoptose der Zielzellen induziert durch FasL-exprimierende NK-Zellen zu der beobachteten ErbB2-unabhängigen Lyse beitragen. Weiterhin ist aber auch eine sekretorische Lyse durch die NK-Zellen wahrscheinlich, da nach einer 24-stündigen Inkubationszeit eine erhöhte kontakturnabhängige Degranulation festgestellt wurde (siehe Abb. 4.20 C), die selbst bei einer ungerichteten Ausschüttung von Effektormolekülen zu einem Abtöten der umliegenden Zellen beitragen kann (Hsu *et al*, 2016).

Interessanterweise wurde in Langzeit-Ko-Kulturen zwar ein CAR-unabhängiges Abtöten der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch parentale NK-92 Zellen festgestellt, allerdings war diese im Vergleich zur Lyse von p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen reduziert. Dies deutet auf eine höhere Resistenz der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden gegenüber der NK-Zell-vermittelten, ErbB2-unabhängigen Zytotoxizität

hin. Auslöser dafür könnte die Expression der neoplastischen Treibermutationen in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden sein, welche zu morphologischen und molekularen Veränderungen beitragen (siehe Abschnitt 5.2.2). Die Inaktivierung von p53 kann beispielsweise zu einer erhöhten Therapie-Resistenz führen, bei welcher sich Tumorzellen durch eine verringerte Sensitivität gegenüber dem Effektormolekül Granzym B oder dem Todesliganden FasL auszeichnen (Chollat-Namy *et al*, 2019; Li *et al*, 2003; Sordo-Bahamonde *et al*, 2020; Wachter *et al*, 2013). Dies wird beispielsweise durch eine reduzierte Expression von Apoptose-fördernden regulatorischen Proteinen und Enzymen vermittelt (Alvarado-Ortiz *et al*, 2021). In nachfolgenden Zytotoxizitätsexperimenten wurden daher p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden mitgeführt, die ebenfalls einen Funktionsverlust von p53 und die Expression von Kras<sup>G12V</sup> aufweisen (siehe Abb. 4.22 und Abschnitt 5.2.1). Um die Lyse der Zielzellen durch natürliche Zytotoxizitätsmechanismen der NK-Zellen zu minimieren und somit den therapeutischen Effekt einer ErbB2-gerichteten Therapie mit CAR-NK-Zellen besser beurteilen zu können, wurde in nachfolgenden Untersuchungen zudem die Dauer der Ko-Kulturen auf 12 h reduziert (siehe Abb. 4.23 und 4.24).

In einem Luciferase-Reporterassay wurde dabei weiterhin eine durch parentale und CAR-exprimierende NK-Zellen-vermittelte natürliche, ErbB2-unabhängige Zytotoxizität gegenüber p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup> festgestellt (siehe Abb. 4.23). Bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 wurde zudem ein ErbB2-unabhängiges Abtöten der p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>- und ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden beobachtet. Durch den hohen Überschuss an NK-Zellen kann dies auf die basale Degranulation der Effektorzellen und/oder Todesliganden-vermittelte Apoptose der Zielzellen zurückgeführt werden. Bei geringeren E/T-Verhältnissen von 5:1 und 1:1 wurde hingegen weder eine Lyse von p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch parentale oder CAR-exprimierende NK-Zellen noch ein Abtöten der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch parentale NK-92 Zellen festgestellt. Somit zeigten p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden wie auch ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden eine im Vergleich zu p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Zellen erhöhte Resistenz gegenüber den natürlichen Zytotoxizitätsmechanismen der NK-Zellen. Sie eignen sich daher als relevante Kontrolle zur Beurteilung einer ErbB2-gerichteten Anti-Tumoraktivität. Bei den geringeren E/T-Verhältnissen von 5:1 und 1:1 zeigte sich eine Antigen-abhängige Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch NK-92/5.28.z Zellen (siehe Abb. 4.23), die im Vergleich zu einer 4-stündigen Ko-Kultur weiter gesteigert war (vgl. Abb.19).

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass die ErbB2-spezifische Lyse der Organoiden durch NK-Zellen sowohl von der Inkubationszeit als auch vom E/T-Verhältnis abhängig ist. Dabei führen hohe E/T-Verhältnisse und lange Inkubationszeiten zu einer gesteigerten Antigen-unabhängigen natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen. Bei optimierten Ko-Kultivierungsbedingungen konnte allerdings die CAR-vermittelte Lyse der Antigen-positiven ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden durch NK-92/5.28.z Zellen eindeutig nachgewiesen werden. Dies wurde durch eine mikroskopische Zeitrafferanalyse bestätigt, bei

welcher ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide, nicht aber p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen spezifisch durch NK-92/5.28.z Zellen abgetötet wurden (siehe Abb. 4.24 B und Tab. 4.1). Signifikante Unterschiede in der Lyse zeigten sich bereits nach einer 2-stündigen Inkubation und verstärkten sich über den Zeitraum des Experiments. Während für p53<sup>fl/fl</sup>/LSL-Kras<sup>G12V</sup>-Organoide eine vergleichbare natürliche Zytotoxizität der parentalen und CAR-exprimierenden NK-Zellen ermittelt wurde, wiesen ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide nach einer 12-stündigen Ko-Kultur keine Sensitivität gegenüber parentalen NK-92 Zellen auf, was die ErbB2-gerichtete Anti-Tumor-Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen ebenfalls verdeutlicht (siehe Abb. 4.24 B und Tab. 4.1).

Da es sich bei den analysierten Aufnahmen der mikroskopischen Zeitrasteranalyse um Maximumintensitätsprojektionen handelt, bei welchen das Signal aufeinander folgender Schnittebenen in eine zweidimensionale Projektion verrechnet wird, wurde in den durchgeführten Analysen auch die z-Koordinate und somit das Volumen der Organoiden berücksichtigt. Neben der Lysekinetik wurden dadurch auch räumliche Erkenntnisse gewonnen. Dabei zeigte sich, dass die Mamma-Organoide nicht von NK-Zellen infiltriert wurden, sondern eine Anreicherung der Effektorzellen und Lyse der Zielzellen vor allem in der Peripherie stattfand (siehe Abb. 4.24 A). Diese Beobachtung wird auch durch eine Korrelationsanalyse unterstützt, bei welcher ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der Gesamtlyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide durch NK-92/5.28.z Zellen und der Organoid-Fläche festgestellt wurde (siehe Abb. 4.25 und Tab. 4.2). Bei zunehmender Größe sind innen liegende Zielzellen durch die fehlende Infiltration von NK-Zellen nicht oder erst nach der vollständigen Lyse der äußeren Zielzellen zugänglich. Da bei steigendem Volumen der Organoiden die Oberfläche nicht im gleichen Maß zunimmt, können im Vergleich zu kleineren Organoiden pro Volumeneinheit weniger Effektorzellen simultan die Lyse des Organoids vorantreiben. Diese Beobachtung wurde auch bei soliden Tumorerkrankungen gemacht, bei welchen die Akkumulation von tumorinfiltrierenden NK-Zellen reduziert ist und unter anderem durch zelluläre Barrieren erschwert wird (Mattiola, 2021). Da CD56<sup>dim</sup>-NK-Zellen vor allem im Blut- und im Lymphsystem zirkulieren, erfolgt eine effiziente Infiltration hauptsächlich in stark vaskularisierte Gewebe wie beispielsweise die Lunge oder die Leber (Grégoire *et al*, 2007; Shi *et al*, 2011). In der Regel weisen solide Tumoren trotz Neoangiogenese mit zunehmender Größe eine im Vergleich zu gesundem Gewebe verringerte Durchblutung auf und besitzen insbesondere im Zentrum stark unterversorgte Regionen (Nagy *et al*, 2009). Daher ist die Lokalisation von infiltrierenden NK-Zellen häufig auf Randregionen, perivaskuläre Bereiche innerhalb des Tumors und tertiäre lymphoide Strukturen beschränkt, und eine NK-Zell-vermittelte Lyse von Tumorzellen außerhalb dieser Bereiche ist stark limitiert (Breznik *et al*, 2022; Ichise *et al*, 2022; Liu *et al*, 2022; Platonova *et al*, 2011; Ran *et al*, 2022).

Zusammenfassend konnte die ErbB2-spezifische Lyse von Antigen-positiven Organoiden durch CAR-NK-Zellen auch in mikroskopischen Experimenten bestätigt werden, bei welchen Zielzellen vor allem in der Organoid-Peripherie abgetötet wurden. Wie solide Tumoren organisieren sich Mamma-Organoide in einem dichten Zellverband, sodass eine Infiltration von NK-Zellen erschwert und/oder gänzlich verhindert wird. Dennoch zeigte sich in 12-stündigen Ko-Kulturen eine effiziente Lyse der ErbB2-positiven Organoide mit positivem linearem Zusammenhang zwischen Organoid-Fläche und Gesamtlyse durch die CAR-NK-Zellen. Die hier etablierten Organoide wiesen somit ein für das Mammakarzinom erwartetes Therapieansprechen auf und bildeten das Migrationsverhalten der Effektorzellen realistisch ab. In den durchgeführten *in vitro* Analysen konnten allerdings wichtige Eigenschaften solider Tumoren, wie beispielsweise ein immunsuppressives Tumormikromilieu (engl., *Tumor microenvironment*, TME), weitere physikalische Barrieren wie *Cancer associated fibroblasts* (CAFs) aber auch die Kommunikation mit endogenen Immunzellen und die Möglichkeit zur Induktion einer sekundären Immunantwort nicht nachgebildet werden. Dies erfordert stattdessen eine abschließende *in vivo* Evaluierung. Organoide stellen jedoch ein wichtiges Bindeglied zwischen 2D-Kulturen und Tiermodellen dar.

#### 5.4. *In vivo* Engraftment und Plastizität der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide

ErbB2-exprimierende Organoide wurden durch CAR-exprimierende NK-92 Zellen effizient lysiert. Dabei führte dieser Ansatz zu einem verbesserten *in vitro* Modell, das wichtige Erkenntnisse lieferte, welche nicht durch klassische 2D-Kulturen erbracht werden konnten. Die abschließende Evaluierung einer zellulären Immuntherapie erfordert derzeit allerdings noch immer entsprechende *in vivo* Modellen, bei welchen die Tumorprogression und die komplexen interzellulären Wechselwirkungen innerhalb eines für die zu untersuchende Erkrankung typischen Mikromilieus erfolgen. Als wichtiger Schritt in diese Richtung wurde daher das *Engraftment* der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoide in immundefizienten und immunkompetenten Mäusen untersucht.

##### 5.4.1 *Engraftment* und Tumorprogression *in vivo* passagierter Organoide nach Transplantation in immundefiziente Mäuse

Gesunde Zellen, die eine kontrollierte Zellteilung und eine direkte Abhängigkeit von Wachstumsfaktoren aufweisen, können nach der Transplantation in immundefiziente Mäuse in der Regel keinen Tumor ausbilden. Um das *Engraftment* der Organoide und ihre Tumorigenität zu bestimmen, wurden ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen subkutan in die Flanke von NSG-Mäusen transplantiert. In allen Tieren war dabei ein Anwachsen der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Allografte zu beobachten (siehe Abb. 4.26). Die *ex vivo* Induktion von onkogenem Kras<sup>G12V</sup> bei gleichzeitiger Inaktivierung von p53 war somit ausreichend, um



tumorinitiierende Zellen zu generieren, die durch das *Engraftment* in NSG-Mäusen einen direkten Nachweis der malignen Transformation lieferten.

Zusätzlich wurde die Tumorprogression und Plastizität der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen durch serielles *in vivo* Passagieren weiter gefördert. Organoid-Derivate der zweiten *in vivo* Passage zeigten dabei typische molekulare Veränderungen einer Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT). EMT ist ein zellbiologischer Prozess, welcher eine wichtige Rolle bei der Embryogenese, Geweberegeneration und Wundheilung spielt, allerdings auch mit fortschreitender Karzinogenese in Tumorzellen beobachtet wird und dabei die Fähigkeit zur Metastasierung fördert (Kalluri & Weinberg, 2009; Kyuno *et al*, 2021). Durch eine veränderte Genexpression erfolgt ein schrittweiser Übergang von Epithelzellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften (Bakir *et al*, 2020; Lamouille *et al*, 2014). Epitheliale Zellen zeichnen sich unter anderem durch zahlreiche Adhäsionsmoleküle und *Tight junctions* aus, die kohäsive Interaktionen mit benachbarten Zellen ermöglichen und eine spezifische Zellpolarität vermitteln. Im Gegensatz dazu weisen die durch EMT induzierten mesenchymalen Zellen eine höhere Migrationsfähigkeit und Invasivität auf, die durch eine Reorganisation des Zytoskeletts und einer Herunterregulation oder einen Verlust der epithelialen Adhäsionsmoleküle, *Tight junctions*, apiko-basalen Zellpolarität und Zell-Matrix-Interaktion bedingt sind (Lamouille *et al*, 2014). Nach der Transplantation von einfach passagierten Organoiden in NSG-Mäuse wurde bei allen Tumoren der zweiten *in vivo* Passage ein hoher Anteil an Zellen identifiziert, die sich durch eine verminderte Expression des epithelialen Markers EpCAM auszeichneten (siehe Abb. 4.26 C). Nach durchflusszytometrischer Anreicherung von EpCAM<sup>+</sup> und EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen eines repräsentativen Organoid-Derivats (siehe Abb. 4.27 A) wurden starke Unterschiede in der Morphologie der Zellen festgestellt. Im Gegensatz zu EpCAM<sup>+</sup>-Zellen, wiesen EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen einen mesenchymalen, spindelförmigen Phänotyp auf (siehe Abb. 4.27 B).

In die im Verlauf der Tumorprogression auftretenden EMT sind spezifische Signalwege, Transkriptionsfaktoren und microRNAs involviert, die eine veränderte Genexpression vermitteln und dadurch beispielsweise eine Repression von Adhäsionsmolekülen und die Aktivierung von mesenchymalen Proteinen des Zytoskeletts verursachen (Bakir *et al*, 2020; Feng *et al*, 2022; Ribatti *et al*, 2020). Eine wichtige Rolle bei der Induktion der EMT übernehmen dabei Zytokine und Signalmoleküle, wie *Hepatocyte growth factor* (HGF), *Epidermal growth factor* (EGF), *Transforming growth factor-β* (TGF-β) und Liganden des Wnt-Signalwegs (Farrell *et al*, 2014; Zhang *et al*, 2016b). Diese werden beispielsweise durch Endothelzellen, mesenchymale Stammzellen oder CAFs sekretiert und könnten so auch nach Ausbildung eines Tumorstromas eine EMT in ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Allograften induzieren (Fiori *et al*, 2019; Khalaf *et al*, 2021; Saitoh, 2018; Thiery *et al*, 2009). Dabei gibt es Hinweise auf einen synergistischen Effekt von Faktoren wie TGF-β und der Expression von onkogenem Kras (Arner *et al*, 2019; Saitoh, 2018). Die Transduktion der Signalmoleküle vermittelt die Expression von

Transkriptionsfaktoren wie SNAIL, TWIST und ZEB1, die als Schlüsselfaktoren zur Aktivierung eines mesenchymalen Phänotyps gelten (Kalluri & Weinberg, 2009; Lamouille *et al*, 2014). Der Transkriptionsfaktor ZEB1 fördert dabei die Plastizität von Tumorzellen, die Metastasierung und trägt zu einem inflammatorischen, immunsuppressiven Tumormikromilieu bei (Drápela *et al*, 2020). Neben einer direkten Repression des Adhäsionsmoleküls E-Cadherin wird ZEB1 auch mit einer Hochregulation mesenchymaler Marker assoziiert (Lamouille *et al*, 2014; Sánchez-Tilló *et al*, 2010; Wu *et al*, 2020). Auch bei zweifach *in vivo* passagierten EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen konnte die Expression von ZEB1 nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.27 D). Gleichzeitig zeigten diese Zellen eine verringerte E-Cadherin Expression (siehe Abb. 4.27 C und D). Als epitheliale Adhäsionsmoleküle fördern EpCAM und E-Cadherin Zell-Zell-Kontakte und tragen somit zu einer Aufrechterhaltung von Zellverbänden und einer Zellpolarität bei (Huang *et al*, 2018; Pečina-Šlaus, 2003). Bei der EMT korreliert die Abnahme von E-Cadherin häufig mit einer Hochregulation des Adhäsionsmoleküls N-Cadherin (Loh *et al*, 2019). Dieser sogenannte *Cadherin-switch* wurde hier auch bei EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen beobachtet, die eine gesteigerte Expression von N-Cadherin aufwiesen (siehe Abb. 4.27 C und D). Weiterhin zeigten diese Zellen eine Hochregulation des mesenchymalen Intermediärfilaments Vimentin, welches zusammen mit N-Cadherin eine erhöhte Resistenz gegen Anoikis, ein gesteigertes Invasionspotenzial und die Fähigkeit einer gerichteten Migration vermittelt (Ko *et al*, 2012; Mrozik *et al*, 2018; Ridge *et al*, 2022).

Da in EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen zwar eine starke Reduktion, allerdings keine vollständige Abwesenheit der epithelialen Marker beobachtet wurde, kann bei gleichzeitiger Expression von Vimentin und N-Cadherin von einem intermediären Phänotyp der Zellen ausgegangen werden, die eine partielle bzw. hybride EMT vollzogen haben (Bakir *et al*, 2020). Krebszellen mit einem intermediären EMT-Phänotyp besitzen eine höhere Aggressivität und Therapieresistenz und sind mit einer gesteigerten Tumorigenität assoziiert (Sinha *et al*, 2020). Beim Mammakarzinom und anderen Tumorentitäten zeichnen sich solche Zellen häufig auch durch Stammzelleigenschaften aus (Kröger *et al*, 2019; Sinha *et al*, 2020). In EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen, nicht aber in der Ausgangslinie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> oder EpCAM<sup>-/high</sup>-Zellen wurde eine CD24<sup>-/low</sup>CD44<sup>+ /high</sup>-Population beobachtet (siehe Abb. 4.28 B), die dem Phänotyp von Tumorstammzellen (engl., *Cancer stem cells*, CSCs) des Mammakarzinoms entspricht (Camerlingo *et al*, 2014). Neben einer hybriden EMT gilt zudem der Transkriptionsfaktor ZEB1, welcher in EpCAM<sup>-/low</sup>-Zellen exprimiert wird (siehe Abb. 4.27 D), als molekularer Treiber für das Erlangen und Aufrechterhalten von Stammzelleigenschaften von Krebszellen (Perez-Oquendo & Gibbons, 2022; Wang *et al*, 2015; Wu *et al*, 2020). Da Krebsstammzellen durch die Fähigkeit der Selbsterneuerung und der asymmetrischen Zellteilung gekennzeichnet sind, gelten sie auch als Zellpopulation mit dem höchsten Potenzial zur Tumorentstehung. Dies kann somit den beobachteten Wachstumsvorteil der EpCAM<sup>-/low</sup>-Allografte gegenüber EpCAM<sup>-/high</sup>-Zellen erklären (Suraneni & Badaeux, 2013).

Zusammenfassend konnte durch das *Engraftment* der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen in NSG-Mäusen die Tumorigenität der etablierten Organoid-Linie nachgewiesen werden, die durch serielles *in vivo* Passagieren weiter gefördert wurde. In Tumor-Organoiden der zweiten *in vivo* Passage wurden dabei Zellen mit hybridem EMT-Phänotyp und Tumorzellen mit stammzelltypischen Eigenschaften identifiziert. Die molekularen Veränderungen dieser Zellen blieben in nachfolgend *ex vivo* Organoid-Kulturen weitestgehend erhalten. Entsprechende Zellen zeigten nach der dritten Transplantationsrunde in NSG-Mäusen weiterhin Anzeichen einer EMT, wie morphologische Unterschiede und eine verringerte EpCAM-Expression (siehe Abb. 4. 28 D).

#### 5.4.2 *Engraftment in vivo* passasierter Organoide in immunkompetenten Mäusen

Um das *Engraftment* der modifizierten Mamma-Organoide in immunkompetenten Tieren zu untersuchen, wurden ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen sowie Zellen jeder einzelnen *in vivo* Passage aus den NSG-Mäusen subkutan in die Flanke von immunkompetenten C57BL/6-Mäusen transplantiert. Dabei wurde zunächst ein Anwachsen der Tumorzellen beobachtet, die jedoch etwa zwei Wochen nach der Transplantation wieder abgestoßen wurden (siehe Abb. 4. 29 A). Da die Tumorigenität aller Organoid-Derivate bereits in NSG-Mäusen nachgewiesen worden war (siehe Abb. 4. 26 B und 4. 28 C), ist die Abstoßung der transplantierten Zellen höchstwahrscheinlich auf eine Immunreaktion der C57BL/6-Mäuse zurückzuführen.

In allen Organoid-Derivaten ließ sich die Expression von NKG2D-Liganden und/oder MHC-Klasse-I-Molekülen nachweisen (siehe Abb. 4. 29 B). Die murinen NKG2D-Liganden Mult1 und Isoformen der Rae- und H60-Familie sind in gesundem Gewebe nicht oder nur geringfügig vorzufinden, können allerdings durch zellulären Stress in virusinfizierten oder transformierten Zellen hochreguliert werden (Guerra *et al*, 2003; Trembath & Markiewicz, 2018; Wensveen *et al*, 2018). Da Immuneffektorzellen wie NK-Zellen und zytotoxische T-Zellen die Liganden über den korrespondierenden NKG2D-Rezeptor erkennen und so transformierte Zellen abtöten können, wird der NKG2D/NKG2D-L-Achse eine wichtige Stellung in der Immunüberwachung zugeschrieben (Stojanovic *et al*, 2018). In NK-Zellen führt die Stimulation des NKG2D-Rezeptors zu einer direkten Immunantwort, die sich in einer NK-Zell-vermittelten Lyse der NKG2D-Liganden-exprimierenden Zielzellen und der Produktion von Zytokinen äußert (Duan *et al*, 2019). Im Gegensatz dazu übernimmt NKG2D in CD8<sup>+</sup>-T-Zellen die Funktion eines kostimulatorischen Rezeptors, welcher bei gleichzeitiger Aktivierung des T-Zell-Rezeptors (engl., *T cell receptor*, TCRs) zu einer gesteigerten Effektorfunktion beiträgt (Wensveen *et al*, 2018). Eine NKG2D-vermittelte Abstoßung von Liganden-positiven Tumorzellen wurde in verschiedenen *in vivo* Modellen gezeigt und könnte auch hier bei einer Immunantwort gegen die unterschiedlichen Organoid-Derivate eine Rolle spielen (Cerwenka *et al*, 2001; Diefenbach *et al*, 2001).

Weiterhin kann die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen bei Vorhandensein entsprechender T-Zell-Antigene zu einer erhöhten Immunogenität von Tumorzellen beitragen. Nach Prozessierung intrazellulärer Proteine werden antigene Peptide im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen an die Oberfläche der Zellen transportiert und zytotoxischen T-Zellen präsentiert (Yewdell *et al*, 2003). Da autoreaktive CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei der Reifung einer negativen Selektion unterliegen und so eliminiert werden, findet eine Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen in der Regel nur nach Interaktion mit MHC-Klasse-I-Molekül/Peptid-Komplexen statt, die körperfremde oder Neoantigene präsentieren und mit hoher Affinität von entsprechenden Antigen-spezifischen T-Zellen gebunden werden (Xing & Hogquist, 2012). Die Transplantation der Mamma-Organoid erfolgte in C57BL/6-Mäusen, welche dem genetischen Hintergrund der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen und der abgeleiteten *in vivo* Passagen entsprechen. Allerdings exprimieren ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen die zusätzliche Transgene ErbB2,  $\beta$ -Geo, onkogenes Kras<sup>G12V</sup> und ein trunkiertes p53-Protein. In C57BL/6-Mäusen stellen diese Proteine allesamt potenzielle Neoantigene dar und könnten somit zu einer Aktivierung von T-Zellen beitragen. Darüber hinaus fördert die maligne Transformation und chromosomale Instabilität der Zellen (siehe Abb. 4.14) eine weitere Ansammlung von Mutationen, die zusätzliche Neoantigene beinhalten könnten. Da nahezu alle der hier untersuchten Organoid-Derivate MHC-Klasse-I-Moleküle exprimierten und so das Potenzial zur Antigenpräsentation besaßen, könnte auch eine T-Zell-vermittelte Lyse der Tumorzellen zur Abstoßung der subkutan transplantierten ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen in C57BL/6-Mäusen beigetragen haben.

#### **5.4.3 *In vitro* Anti-Tumoraktivität von CAR-NK-Zellen gegen *in vivo* passagierte Organoid mit heterogenem Phänotyp**

Das wiederholte *in vivo* Passagieren der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen in immundefizienten Mäusen förderte die Tumorprogression, durch welche Organoid-Derivate mit hybridem EMT- und Tumorstammzellphänotyp entstanden (siehe Abb. 4.27 und 4.28). Sowohl CSCs als auch Zellen mit molekularen Veränderungen einer EMT wird dabei eine erhöhte Resistenz gegen konventionelle Behandlungsansätze wie die Chemo- oder Strahlentherapie zugesprochen. Dies ist unter anderem auf eine im Vergleich zu epithelialen Tumorzellen geringere Proliferationsrate, gesteigerte Autophagie, einen veränderten Transport und Abbau von Wirkstoffen sowie eine erhöhte Expression von Proteinen, die Sauerstoffradikale abfangen, zurückzuführen (Arnold *et al*, 2020; Basu *et al*, 2022; Begicevic & Falasca, 2017; Shibue & Weinberg, 2017; Zhou *et al*, 2021). Weiterhin wurde auch eine geringere Sensitivität gegenüber immuntherapeutischen Ansätzen beschrieben (Shibue & Weinberg, 2017). Diese beruht auf Evasionsmechanismen wie einer erhöhten Resistenz gegen das Effektormolekül GzmB durch die Expression spezifischer Inhibitoren, der Suppression von Immunzellen durch *Immun-Checkpoints*

wie PD-L1 oder die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF- $\beta$  und IL-10, und einer geringeren Sensitivität gegenüber Apoptose durch die Expression von anti-apoptotischen Proteinen (Chen *et al*, 2014; Tsuchiya & Shiota, 2021; Wang & Scadden, 2015). In verschiedenen Studien wurde daher gezeigt, dass CSCs die Zytotoxizität von Immuneffektorzellen beeinflussen und/oder eine geringere Sensitivität gegenüber NK- und T-Zell-basierten Therapieansätzen aufweisen (Cognac *et al*, 2022; Jin & Kim, 2021; Reim *et al*, 2009; Wang *et al*, 2014). Da auch in den *in vivo* passagierten Organoid-Derivaten Zellen mit EMT-Phänotyp und CSCs identifiziert wurden, wurden mögliche Resistenzen der Tumorzellen gegenüber NK-92/5.28.z Zellen zunächst in einem durchflusszytometrischen Zytotoxizitätsassay untersucht. Keines der Organoid-Derivate zeigte dabei eine im Vergleich zur Ausgangslinie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> verminderte Sensitivität gegenüber den ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zellen (siehe Abb. 4.30). Bei einzelnen Linien der zweiten und dritten *in vivo* Passage wurde nach der Ko-Kultur mit NK-92/5.28.z Zellen sogar eine leicht erhöhte Lyse beobachtet (siehe Abb. 4.30). Die unterschiedliche Sensitivität gegenüber NK-92/5.28.z Zellen lässt sich dadurch erklären, dass die verschiedenen Organoid-Linien jeder *in vivo* Passage aus individuellen Tumoren generiert wurden und dabei unterschiedlichste Anpassungen an das jeweilige Tumormikromilieu erfolgen und zusätzliche Mutationen auftreten konnten.

In vorangegangenen Experimenten wurden bereits die Unterschiede 2D- und 3D-basierter Zellkulturen dargestellt, die sich vor allem in der im Vergleich zu dissoziierten Zellen verringerten Lyse der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden zeigten (siehe Abb. 4.19). Dies ließ sich auf eine komplexere Architektur der Mamma-Organoide und der physiologischeren Nachbildung von Mammatumoren zurückführen. Da bei Organoid-Derivaten der zweiten *in vivo* Passage morphologische Unterschiede zwischen EpCAM<sup>/low</sup>-Zellen und EpCAM<sup>/high</sup>-Zellen beobachtet wurden, wurde abschließend untersucht ob diese phänotypischen Eigenschaften die Aktivität der CAR-NK-Zellen beeinflussen können. Beispielsweise zeigten EpCAM<sup>/low</sup>-Zellen eine veränderte Expression verschiedener EMT-Marker (siehe Abb. 4.27 C und D), die eine angepasste Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion erfordert und sich bei der Kultivierung in Matrigel gegenüber EpCAM<sup>high</sup>-Zellen in stärker verzweigten, weniger dichten Zellverbänden äußerte (siehe Abb. 4.27 B). In mikroskopischen Zeitrafferaufnahmen wurde jedoch trotz der großen morphologischen Unterschiede zwischen EpCAM<sup>/low</sup>- und EpCAM<sup>high</sup>-Organoiden der zweiten *in vivo* Passage keine Unterschiede in der Lyseaktivität der NK-92/5.28.z festgestellt (siehe Abb. 4.31). Eine ähnliche Sensitivität der Organoid-Derivate gegenüber ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zellen zeigte sich auch im Vergleich zur Ausgangslinie ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup> (siehe Abb. 4.31). Demnach besitzen Tumorzellen mit EMT- und CSC-Phänotyp keine erhöhte Resistenz gegen NK-92 Zellen und können durch CAR-exprimierende NK-Zellen effizient lysiert werden. Entsprechend stellen NK-92/5.28.z Zellen einen vielversprechenden Therapieansatz bei metastasierendem ErbB2-positivem Mammakarzinom

dar, bei welchem systemisch applizierte CAR-NK Zellen auch Tochtergeschwülste und zirkulierende Tumorzellen mit heterogenem Phänotyp effizient abtöten könnten.

## 5.5 Ausblick

In dieser Doktorarbeit wurden verschiedene Organoid-Linien und Methoden entwickelt, die eine Untersuchung von ErbB2-spezifischen CAR-NK-Zellen in einem neuen 3D-Modell des ErbB2-positiven Mammakarzinoms ermöglichten. Dabei wurde eine im Vergleich zu konventionellen 2D-Modellen unterschiedliche Anti-Tumor-Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen festgestellt, die sich in einer verringerten Lyse der Organoide widerspiegelte und so ein für das Mammakarzinom realistischeres Therapieansprechen zeigte. Wichtige Erkenntnisse wie beispielsweise der Nachweis einer erhöhten Resistenz von transformierten Organoiden gegenüber der natürlichen Zytotoxizität der NK-Zellen, die begrenzte Infiltrationsfähigkeit von NK-92 Zellen und die weiterhin erhaltene Anti-Tumor-Aktivität von NK-92/5.28.z Zellen gegen heterogene Organoid-Derivate mit EMT- und CSC-Phänotyp konnten erst durch die Verwendung von 3D-Kulturen gewonnen werden. Dabei wurde für die Evaluierung der CAR-NK-Zell-Therapie eine organotypische Kompartimentierung und Architektur der Mamma-Organoide erreicht. Das Therapieansprechen wird *in vivo* allerdings auch von Stromazellen beeinflusst. Entsprechend könnten aufbauend auf die hier erarbeiteten Erkenntnisse in zukünftigen Arbeiten *in vitro* Modelle etabliert werden, die neben Tumorzellen auch weitere Zelltypen beinhalten. Viele Studien beschäftigen sich derzeit mit verbesserten Organoid-Modellen, die beispielsweise durch CAFs, Endothelzellen oder auch immunsuppressive Immunzellen ergänzt werden (Devarasetty *et al*, 2020). Wie auch im Tumormikromilieu könnten dadurch interzelluläre Wechselwirkungen entstehen, weitere zelluläre Barrieren ausgebildet und ein für solide Tumoren vorherrschendes Profil an Zytokinen und Immunmodulatoren rekonstruiert werden. Da der Organoid-Technologie ein hohes Anwendungspotenzial in der personalisierten Medizin zugeschrieben wird, könnte auch durch Etablierung von PDOs (engl., *Patient derived organoids*) die Wirksamkeit der ErbB2-spezifischen NK-92/5.28.z gegen Tumorzellen individueller Patientinnen bestimmt werden (Sachs *et al*, 2018; Yang *et al*, 2018).

Eine abschließende Evaluierung der CAR-NK-Zelltherapie sollte dennoch in Tiermodellen erfolgen. Da ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Organoiden und abgeleitete *in vivo* Passagen in immunkompetenten Tieren abgestoßen wurden, könnte die direkte Anti-Tumor-Aktivität der NK-92/5.28.z Zellen gegen solche Tumoren zunächst in NSG-Mäusen untersucht werden. Neben der subkutanen Transplantation von Tumorzellen könnte ein orthotopes Mausmodell Aufschlüsse über die Infiltrationsfähigkeit der NK-92 Zellen in das Brustfettpolster von Mäusen liefern. Darüber hinaus könnte in einem experimentellen Metastasierungsmodell die Anti-Tumor-Aktivität von NK-92/5.28.z Zellen gegen zirkulierende

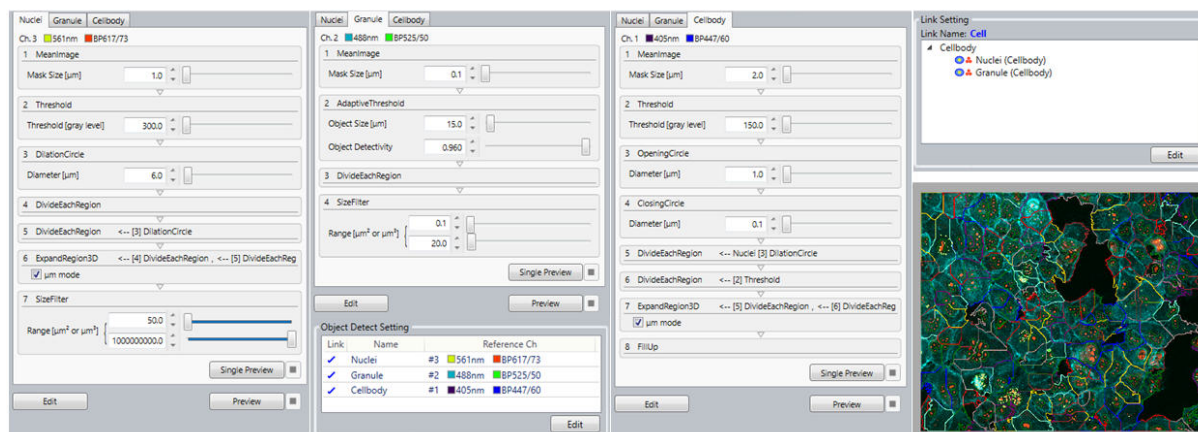
Tumorzellen oder sekundäre Tumorgeschwülste untersucht werden. In vorangegangenen Arbeiten der Gruppe wurde gezeigt, dass NK-92/5.28.z Zellen neben einer direkten Lyse von Tumorzellen auch die Fähigkeit besitzen, eine endogene Immunantwort gegen Tumorzellen zu induzieren (Zhang *et al*, 2016a). Dies kann nur im immunkompetenten Tiermodell untersucht werden. Daher sollte versucht werden, durch angepasste Transplantationsbedingungen wie beispielsweise eine Optimierung der Zellzahl, die Injektion eines Zell-Matrigel-Gemischs oder die Transplantation in isogene CKP-Mäuse das *Engraftment* der ErbB2/p53<sup>-/-</sup>/Kras<sup>G12V</sup>-Zellen und der abgeleiteten Organoid-Derivate zu verbessern.



## 6. Anhang

### Anhang 1: Quantifizierung von DNA-Doppelstrangbrüchen mit Hilfe der CQ1 Software

Gewählte Parameter zur Prozessierung der mikroskopischen Aufnahmen und Generierung einer Maske, die eine Quantifizierung der  $\gamma$ -H2AX-Foci für individuelle Zellen ermöglichte.



## Anhang 2: ImageJ-Macro zur Quantifizierung der Nuclei-Fläche

### Nuclei\_area\_measurement

```
outputDir = getDirectory("Choose Output Directory");

//setScale in micron
selectWindow("Composite_example.tif");
run("Set Scale...", "distance=312 known=100 unit=micron");
run("Scale Bar...", "width=100 height=76 thickness=4 font=14 color=White background=None
location=[Lower Right] horizontal bold overlay");
//splitChannels
selectWindow("Composite_example.tif");
run("Split Channels");
selectWindow("C1-Composite_example.tif");
rename("Hoechst");
selectWindow("C2-Composite_example.tif");
close();
selectWindow("Hoechst");
//run("Brightness/Contrast...");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
//setTreshold nuclei
setAutoThreshold("Huang dark");
run("Convert to Mask");
run("Erode");
run("Watershed");
//measure area
run("Analyze Particles...", "size=20-20000 display exclude clear include overlay add composite");
saveAs("Results", "outputDir + ".csv");
```

### Anhang 3: ImageJ-Macro zur Quantifizierung der Organoid-Fläche

#### Organoid\_area\_mesurment

```
outputDir = getDirectory("Choose Output Directory");

//Split channels
selectWindow("Composite_example.png");
run("Split Channels");
selectWindow("Composite_example (blue)");
run("Gaussian Blur...", "sigma=1");
close();
close();
//setScale in micron
run("Set Scale...", "distance=17.0 known=100 unit=micron");
run("Scale Bar...", "width=100 height=470 thickness=4 font=14 color=White background=None
location=[Lower Left] horizontal bold overlay");
//run("Threshold...");run("Duplicate...", " ");
setAutoThreshold("Default dark");
//setThreshold(137, 255);
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Close-");
run("Erode");
run("Watershed");
//analyzeParticles
run("Analyze Particles...", "size=9000-400000 show=[Count Masks] display exclude clear include overlay
add composite");
saveAs("Results", "outputDir + .csv");
```

**Anhang 4: ImageJ-Macro zur Quantifizierung der MFI einer Antikörperfärbung (p53)****p53\_ MFI**

```
outputDir = getDirectory("Choose Output Directory");

//run("Brightness/Contrast...");
selectWindow("Hoechst");
setMinAndMax(95, 316);
run("8-bit");
selectWindow("p53");
setMinAndMax(152, 407);
run("8-bit");
selectWindow("Hoechst");
run("Pseudo flat field correction", "blurring=1");
selectWindow("Hoechst");
close();
selectWindow("Hoechst_background");
run("Median...", "radius=1");
selectWindow("Hoechst_background");
setOption("BlackBackground", true);
run("Convert to Mask");
run("Watershed");
run("Analyze Particles...", "size=80-Infinity circularity=0.50-1.00 exclude overlay add composite");
selectWindow("p53");
roiManager("Measure");
saveAs("Results", "outputDir + .csv");
```

## 7. Literaturverzeichnis

- Abate-Daga D & Davila ML (2016) CAR models: next-generation CAR modifications for enhanced T-cell function. *Molecular Therapy - Oncolytics* 3
- Abel AM, Yang C, Thakar MS & Malarkannan S (2018) Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front Immunol* 9
- Abreu FBD, Schwartz GN, Wells WA & Tsongalis GJ (2014) Personalized therapy for breast cancer. *Clinical Genetics* 86: 62–67
- Adamson ED (1987) Oncogenes in development. *Development* 99: 449–471
- Ahmed N, Brawley VS, Hegde M, Robertson C, Ghazi A, Gerken C, Liu E, Dakhova O, Ashoori A, Corder A, *et al* (2015) Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) –Specific Chimeric Antigen Receptor–Modified T Cells for the Immunotherapy of HER2-Positive Sarcoma. *J Clin Oncol* 33: 1688–1696
- Aisenbrey EA & Murphy WL (2020) Synthetic alternatives to Matrigel. *Nat Rev Mater* 5: 539–551
- Albinger N, Hartmann J & Ullrich E (2021) Current status and perspective of CAR-T and CAR-NK cell therapy trials in Germany. *Gene Therapy*: 1–15
- Alcazar CRGD, Huh SJ, Ekram MB, Trinh A, Liu LL, Beca F, Zi X, Kwak M, Bergholtz H, Su Y, *et al* (2017) Immune Escape in Breast Cancer During In Situ to Invasive Carcinoma Transition. *Cancer Discov* 7: 1098–1115
- Alvarado-Ortiz E, de la Cruz-López KG, Becerril-Rico J, Sarabia-Sánchez MA, Ortiz-Sánchez E & García-Carrancá A (2021) Mutant p53 Gain-of-Function: Role in Cancer Development, Progression, and Therapeutic Approaches. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8
- American Cancer Society (2021) Survival Rates for Breast Cancer. <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/breast-cancer-survival-rates.html> (accessed 16.05.22).
- Anft M, Netter P, Urlaub D, Prager I, Schaffner S & Watzl C (2020) NK cell detachment from target cells is regulated by successful cytotoxicity and influences cytokine production. *Cellular & Molecular Immunology* 17: 347–355
- Arai S, Meagher R, Swearingen M, Myint H, Rich E, Martinson J & Klingemann H (2008) Infusion of the allogeneic cell line NK-92 in patients with advanced renal cell cancer or melanoma: a phase I trial. *Cytotherapy* 10: 625–632
- Arner EN, Du W & Brekken RA (2019) Behind the Wheel of Epithelial Plasticity in KRAS-Driven Cancers. *Front Oncol* 9: 1049
- Arnold CR, Mangesius J, Skvortsova I-I & Ganswindt U (2020) The Role of Cancer Stem Cells in Radiation Resistance. *Front Oncol* 10: 164
- Asselin-Labat M-L, Sutherland KD, Barker H, Thomas R, Shackleton M, Forrest NC, Hartley L, Robb L, Grosveld FG, van der Wees J, *et al* (2007) Gata-3 is an essential regulator of mammary-gland morphogenesis and luminal-cell differentiation. *Nat Cell Biol* 9: 201–209
- Bachmann M (2019) The UniCAR system: A modular CAR T cell approach to improve the safety of CAR T cells. *Immunology Letters* 211: 13–22
- Bakir B, Chiarella AM, Pitarresi JR & Rustgi AK (2020) EMT, MET, plasticity and tumor metastasis. *Trends Cell Biol* 30: 764–776
- Basar R, Daher M & Rezvani K (2020) Next-generation cell therapies: the emerging role of CAR-NK cells. *Blood Advances* 4: 5868–5876
- Basu S, Dong Y, Kumar R, Jeter C & Tang DG (2022) Slow-cycling (dormant) cancer cells in therapy resistance, cancer relapse and metastasis. *Seminars in Cancer Biology* 78: 90–103
- Baugh EH, Ke H, Levine AJ, Bonneau RA & Chan CS (2018) Why are there hotspot mutations in the TP53 gene in human cancers? *Cell Death Differ* 25: 154–160

- Becht S, Bittner RC, Ohmstede A, Pfeiffer A & Roßdeutscher R eds. (2019) Lehrbuch der radiologischen Einstelltechnik Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Begicevic R-R & Falasca M (2017) ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance. *Int J Mol Sci* 18: 2362
- Bhat R & Watzl C (2007) Serial Killing of Tumor Cells by Human Natural Killer Cells – Enhancement by Therapeutic Antibodies. *PLoS ONE* 2: e326
- Billadeau DD & Leibson PJ (2002) ITAMs versus ITIMs: striking a balance during cell regulation. *J Clin Invest* 109: 161–168
- Binstadt BA, Brumbaugh KM, Dick CJ, Scharenberg AM, Williams BL, Colonna M, Lanier LL, Kinet J-P, Abraham RT & Leibson PJ (1996) Sequential Involvement of Lck and SHP-1 with MHC-Recognizing Receptors on NK Cells Inhibits FcR-Initiated Tyrosine Kinase Activation. 10
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP & Salazar-Mather TP (1999) NATURAL KILLER CELLS IN ANTIVIRAL DEFENSE: Function and Regulation by Innate Cytokines. *Annu Rev Immunol* 17: 189–220
- Björklund AT, Carlsten M, Sohlberg E, Liu LL, Clancy T, Karimi M, Cooley S, Miller JS, Klimkowska M, Schaffer M, *et al* (2018) Complete Remission with Reduction of High-Risk Clones following Haploidentical NK-Cell Therapy against MDS and AML. *Clinical Cancer Research* 24: 1834–1844
- Blat D, Zigmond E, Alteber Z, Waks T & Eshhar Z (2014) Suppression of Murine Colitis and its Associated Cancer by Carcinoembryonic Antigen-Specific Regulatory T Cells. *Molecular Therapy* 22: 1018–1028
- Bluestone JA, Buckner JH, Fitch M, Gitelman SE, Gupta S, Hellerstein MK, Herold KC, Lares A, Lee MR, Li K, *et al* (2015) Type 1 diabetes immunotherapy using polyclonal regulatory T cells. *Science Translational Medicine* 7: 315ra189-315ra189
- Bolte S & Cordelières FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *Journal of Microscopy* 224: 213–232
- Boyiadzis M, Agha M, Redner RL, Sehgal A, Im A, Hou J-Z, Farah R, Dorritie KA, Raptis A, Lim SH, *et al* (2017) Phase 1 clinical trial of adoptive immunotherapy using “off-the-shelf” activated natural killer cells in patients with refractory and relapsed acute myeloid leukemia. *Cytotherapy* 19: 1225–1232
- Boyiadzis MM, Dhodapkar MV, Brentjens RJ, Kochenderfer JN, Neelapu SS, Maus MV, Porter DL, Maloney DG, Grupp SA, Mackall CL, *et al* (2018) Chimeric antigen receptor (CAR) T therapies for the treatment of hematologic malignancies: clinical perspective and significance. *J Immunother Cancer* 6: 137
- Brabletz S, Schuhwerk H, Brabletz T & Stemmler MP (2021) Dynamic EMT: a multi-tool for tumor progression. *The EMBO Journal* 40: e108647
- Breznik B, Ko M-W, Tse C, Chen P-C, Senjor E, Majc B, Habič A, Angelillis N, Novak M, Župunski V, *et al* (2022) Infiltrating natural killer cells bind, lyse and increase chemotherapy efficacy in glioblastoma stem-like tumorspheres. *Commun Biol* 5: 1–15
- Brockert T & Karjalainen K (1995) Signals through T cell receptor-zeta chain alone are insufficient to prime resting T lymphocytes. *J Exp Med* 181: 1653–1659
- Bruna A, Rueda OM, Greenwood W, Batra AS, Callari M, Batra RN, Pogrebniak K, Sandoval J, Cassidy JW, Tufegdžic-Vidakovic A, *et al* (2016) A Biobank of Breast Cancer Explants with Preserved Intratumor Heterogeneity to Screen Anticancer Compounds. *Cell* 167: 260-274.e22
- Burger MC, Zhang C, Harter PN, Romanski A, Strassheimer F, Senft C, Tonn T, Steinbach JP & Wels WS (2019) CAR-Engineered NK Cells for the Treatment of Glioblastoma: Turning Innate Effectors Into Precision Tools for Cancer Immunotherapy. *Frontiers in Immunology* 10
- Burnet M (1957) Cancer—A Biological Approach. *Br Med J* 1: 779–786
- Burshtyn DN & Long EO (1997) Regulation through inhibitory receptors: Lessons from natural killer cells. *Trends Cell Biol* 7: 473–479
- Camerlingo R, Ferraro GA, De Francesco F, Romano M, Nicoletti G, Di Bonito M, Rinaldo M, D’Andrea F & Pirozzi G (2014) The role of CD44+/CD24-/low biomarker for screening, diagnosis and monitoring of breast cancer. *Oncology Reports* 31: 1127–1132

- Canonici A, Gijzen M, Mullooly M, Bennett R, Bouguern N, Pedersen K, O'Brien NA, Roxanis I, Li J-L, Bridge E, *et al* (2013) Neratinib overcomes trastuzumab resistance in HER2 amplified breast cancer. *Oncotarget* 4: 1592–1605
- Capuano C, Pighi C, Battella S, Santoni A, Palmieri G & Galandrini R (2019) Memory NK Cell Features Exploitable in Anticancer Immunotherapy. *J Immunol Res* 2019
- Carazas MMG, Pinto JA & Casado FL (2021) Biological bases of cancer immunotherapy. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 23: e3
- Carpenito C, Milone MC, Hassan R, Simonet JC, Lakhai M, Suhoski MM, Varela-Rohena A, Haines KM, Heitjan DF, Albelda SM, *et al* (2009) Control of large, established tumor xenografts with genetically retargeted human T cells containing CD28 and CD137 domains. *PNAS* 106: 3360–3365
- Castriconi R, Carrega P, Dondero A, Bellora F, Casu B, Regis S, Ferlazzo G & Bottino C (2018) Molecular Mechanisms Directing Migration and Retention of Natural Killer Cells in Human Tissues. *Front Immunol* 9
- Casucci M, Falcone L, Camisa B, Norelli M, Porcellini S, Stornaiuolo A, Ciceri F, Traversari C, Bordignon C, Bonini C, *et al* (2018) Extracellular NGFR Spacers Allow Efficient Tracking and Enrichment of Fully Functional CAR-T Cells Co-Expressing a Suicide Gene. *Front Immunol* 9
- Cerwenka A, Baron JL & Lanier LL (2001) Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98: 11521–11526
- Cerwenka A & Lanier LL (2001) Natural killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews Immunology* 1: 41–49
- Cerwenka A & Lanier LL (2016) Natural killer cell memory in infection, inflammation and cancer. *Nat Rev Immunol* 16: 112–123
- Chacón-Martínez CA, Koester J & Wickström SA (2018) Signaling in the stem cell niche: regulating cell fate, function and plasticity. *Development* 145: dev165399
- Chan CJ, Smyth MJ & Martinet L (2014) Molecular mechanisms of natural killer cell activation in response to cellular stress. *Cell Death Differ* 21: 5–14
- Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Finetti P, Adélaïde J, Cervera N, Fekairi S, Xerri L, Jacquemier J, Birnbaum D, *et al* (2006) Gene expression profiling of breast cell lines identifies potential new basal markers. *Oncogene* 25: 2273–2284
- Charlier E, Conde C, Zhang J, Deneubourg L, Valentin ED, Rahmouni S, Chariot A, Agostinis P, Pang P-C, Haslam S, *et al* (2010) SHIP-1 inhibits CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis in primary T lymphocytes and T leukemic cells by promoting CD95 glycosylation independently of its phosphatase activity. 12
- Chen J (2016) The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: a026104
- Chen KH, Wada M, Firor AE, Pinz KG, Jares A, Liu H, Salman H, Golightly M, Lan F, Jiang X, *et al* (2016) Novel anti-CD3 chimeric antigen receptor targeting of aggressive T cell malignancies. *Oncotarget* 7: 56219–56232
- Chen KH, Wada M, Pinz KG, Liu H, Lin K-W, Jares A, Firor AE, Shuai X, Salman H, Golightly M, *et al* (2017) Preclinical targeting of aggressive T-cell malignancies using anti-CD5 chimeric antigen receptor. *Leukemia* 31: 2151–2160
- Chen L & Flies DB (2013) Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol* 13: 227–242
- Chen L, Gibbons DL, Goswami S, Cortez MA, Ahn Y-H, Byers LA, Zhang X, Yi X, Dwyer D, Lin W, *et al* (2014) Metastasis is regulated via microRNA-200/ZEB1 axis control of tumor cell PD-L1 expression and intratumoral immunosuppression. *Nat Commun* 5: 5241
- Chepko G (2005) Breast cancer, stem cells, and the stem cell niche. *Breast Cancer Online* 8: e56
- Chmielewski M & Abken H (2020) TRUCKS, the fourth-generation CAR T cells: Current developments and clinical translation. *ADVANCES IN CELL AND GENE THERAPY* 3: e84



- Chmielewski M, Hombach AA & Abken H (2014) Of CARs and TRUCKs: chimeric antigen receptor (CAR) T cells engineered with an inducible cytokine to modulate the tumor stroma. *Immunol Rev* 257: 83–90
- Cho JH, Collins JJ & Wong WW (2018) Universal Chimeric Antigen Receptors for Multiplexed and Logical Control of T Cell Responses. *Cell* 173: 1426–1438.e11
- Choi PJ & Mitchison TJ (2013) Imaging burst kinetics and spatial coordination during serial killing by single natural killer cells. *PNAS* 110: 6488–6493
- Chollat-Namy M, Ben Safta-Saadoun T, Haferssas D, Meurice G, Chouaib S & Thiery J (2019) The pharmacological reactivation of p53 function improves breast tumor cell lysis by granzyme B and NK cells through induction of autophagy. *Cell Death Dis* 10: 1–20
- Claret F & Vu T (2012) Trastuzumab: Updated Mechanisms of Action and Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Oncology* 2
- Clevers H (2016) Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell* 165: 1586–1597
- Codony-Servat J & Rosell R (2015) Cancer stem cells and immunoresistance: clinical implications and solutions. *Translational Lung Cancer Research* 4
- Cohnen A, Chiang SC, Stojanovic A, Schmidt H, Claus M, Saftig P, Janßen O, Cerwenka A, Bryceson YT & Watzl C (2013) Surface CD107a/LAMP-1 protects natural killer cells from degranulation-associated damage. *Blood* 122: 1411–1418
- Comber JD & Philip R (2014) MHC class I antigen presentation and implications for developing a new generation of therapeutic vaccines. *Therapeutic Advances in Vaccines* 2: 77–89
- Cooper MA, Fehniger TA & Caligiuri MA (2001a) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* 22: 633–640
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, Carson WE & Caligiuri MA (2001b) Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56bright subset. *Blood* 97: 3146–3151
- Cope LM, Fackler MJ, Lopez-Bujanda Z, Wolff AC, Visvanathan K, Gray JW, Sukumar S & Umbricht CB (2014) Do Breast Cancer Cell Lines Provide a Relevant Model of the Patient Tumor Methyloome? *PLoS One* 9
- Corgnac S, Damei I, Gros G, Caidi A, Terry S, Chouaib S, Deloger M & Mami-Chouaib F (2022) Cancer stem-like cells evade CD8+CD103+ tumor-resident memory T (TRM) lymphocytes by initiating an epithelial-to-mesenchymal transition program in a human lung tumor model. *J Immunother Cancer* 10: e004527
- Daher M, Garcia LM, Li Y & Rezvani K (2021) CAR-NK cells: the next wave of cellular therapy for cancer. *Clinical & Translational Immunology* 10: e1274
- Dai X, Cheng H, Bai Z & Li J (2017) Breast Cancer Cell Line Classification and Its Relevance with Breast Tumor Subtyping. *J Cancer* 8: 3131–3141
- Devarasetty M, Forsythe SD, Shelkey E & Soker S (2020) In Vitro Modeling of the Tumor Microenvironment in Tumor Organoids. *Tissue Eng Regen Med* 17: 759–771
- Dey P (2010) Cancer nucleus: Morphology and beyond. *Diagnostic Cytopathology* 38: 382–390
- Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM & Raulet DH (2001) Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumor immunity. *Nature* 413: 165–171
- Dijkstra KK, Cattaneo CM, Weeber F, Chalabi M, van de Haar J, Fanchi LF, Slagter M, van der Velden DL, Kaing S, Kelderman S, *et al* (2018) Generation of tumor-reactive T cells by co-culture of peripheral blood lymphocytes and tumor organoids. *Cell* 174: 1586–1598.e12
- Disis ML (2014) Mechanism of Action of Immunotherapy. *Seminars in Oncology* 41: S3–S13
- Donehower LA (1996) The p53-deficient mouse: a model for basic and applied cancer studies. *Seminars in Cancer Biology* 7: 269–278
- Drápela S, Bouchal J, Jolly MK, Culig Z & Souček K (2020) ZEB1: A Critical Regulator of Cell Plasticity, DNA Damage Response, and Therapy Resistance. *Frontiers in Molecular Biosciences* 7
- Driehuis E, van Hoeck A, Moore K, Kolders S, Francies HE, Gulersonmez MC, Stigter ECA, Burgering B, Geurts V, Gracanin A, *et al* (2019) Pancreatic cancer organoids recapitulate disease and allow

- personalized drug screening. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 26580–26590
- Duan S, Guo W, Xu Z, He Y, Liang C, Mo Y, Wang Y, Xiong F, Guo C, Li Y, *et al* (2019) Natural killer group 2D receptor and its ligands in cancer immune escape. *Molecular Cancer* 18: 29
- Dudley ME, Yang JC, Sherry R, Hughes MS, Royal R, Kammula U, Robbins PF, Huang J, Citrin DE, Leitman SF, *et al* (2008) Adoptive Cell Therapy for Patients With Metastatic Melanoma: Evaluation of Intensive Myeloablative Chemoradiation Preparative Regimens. *J Clin Oncol* 26: 5233–5239
- Duffy SW, Tabár L, Yen AM-F, Dean PB, Smith RA, Jonsson H, Törnberg S, Chen SL-S, Chiu SY-H, Fann JC-Y, *et al* (2020) Mammography screening reduces rates of advanced and fatal breast cancers: Results in 549,091 women. *Cancer* 126: 2971–2979
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ & Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3: 991–998
- Dunn GP, Koebel CM & Schreiber RD (2006) Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 6: 836–848
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD (2004) The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21: 137–148
- Durinikova E, Buzo K & Arena S (2021) Preclinical models as patients' avatars for precision medicine in colorectal cancer: past and future challenges. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 40: 185
- Eastman AE & Guo S (2020) The palette of techniques for cell cycle analysis. *FEBS Letters* 594: 2084–2098
- Edwards A & Brennan K (2021) Notch Signalling in Breast Development and Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 9
- Ehrlich, Paul (1909) Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* Ned Tijdschr Geneesk: 73–290
- Eischen CM (2016) Genome Stability Requires p53. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6: a026096
- Eshhar Z, Waks T, GROSS T & Schindler DG (1993) Specific activation and targeting of cytotoxic lymphocytes through chimeric single chains consisting of antibody-binding domains and the  $\gamma$  or C subunits of the immunoglobulin and T-cell receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*: 5
- Esser R, Müller T, Stefes D, Kloess S, Seidel D, Gillies SD, Aperlo-Iffland C, Huston JS, Uherek C, Schönfeld K, *et al* (2012) NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J Cell Mol Med* 16: 569–581
- Evan GI & Vousden KH (2001) Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411: 342–348
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A & Caligiuri MA (2002) Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood* 100: 1935–1947
- Farkona S, Diamandis EP & Blasutig IM (2016) Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC Medicine* 14: 73
- Farrell J, Kelly C, Rauch J, Kida K, García-Muñoz A, Monsefi N, Turriziani B, Doherty C, Mehta JP, Matallanas D, *et al* (2014) HGF Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Modulating the Mammalian Hippo/MST2 and ISG15 Pathways. *J Proteome Res* 13: 2874–2886
- Fasbender F, Claus M, Wingert S, Sandusky M & Watzl C (2017) Differential Requirements for Src-Family Kinases in SYK or ZAP70-Mediated SLP-76 Phosphorylation in Lymphocytes. *Front Immunol* 8
- Feeney KA, Putker M, Brancaccio M & O'Neill JS (2016) In-depth Characterization of Firefly Luciferase as a Reporter of Circadian Gene Expression in Mammalian Cells. *J Biol Rhythms* 31: 540–550
- Feins S, Kong W, Williams EF, Milone MC & Fraietta JA (2019) An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *American Journal of Hematology* 94: S3–S9
- Feng J, Hu S, Liu K, Sun G & Zhang Y (2022) The Role of MicroRNA in the Regulation of Tumor Epithelial–Mesenchymal Transition. *Cells* 11: 1981
- Fernald K & Kurokawa M (2013) Evading apoptosis in cancer. *Trends in Cell Biology* 23: 620–633
- Feroz W & Sheikh AMA (2020) Exploring the multiple roles of guardian of the genome: P53. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 21: 49

- Finkle D, Quan ZR, Asghari V, Kloss J, Ghaboosi N, Mai E, Wong WL, Hollingshead P, Schwall R, Koeppen H, *et al* (2004) HER2-Targeted Therapy Reduces Incidence and Progression of Midlife Mammary Tumors in Female Murine Mammary Tumor Virus huHER2-Transgenic Mice. *Clin Cancer Res* 10: 2499–2511
- Finton KA & Strong RK (2012) Structural insights into activation of antiviral NK cell responses. *Immunol Rev* 250: 239–257
- Fiori ME, Di Franco S, Villanova L, Bianca P, Stassi G & De Maria R (2019) Cancer-associated fibroblasts as abettors of tumor progression at the crossroads of EMT and therapy resistance. *Mol Cancer* 18: 70
- Fischer EG (2020) Nuclear Morphology and the Biology of Cancer Cells. *ACY* 64: 511–519
- Fitzgerald AA, Li E & Weiner LM (2020) 3D Culture Systems for Exploring Cancer Immunology. *Cancers (Basel)* 13: 56
- Friedrich G & Soriano P (1991) Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev* 5: 1513–1523
- Fry EA, Taneja P & Inoue K (2016) Clinical applications of mouse models for breast cancer engaging HER2/neu. *Integr Cancer Sci Ther* 3: 593–603
- Fu NY, Nolan E, Lindeman GJ & Visvader JE (2020) Stem Cells and the Differentiation Hierarchy in Mammary Gland Development. *Physiological Reviews* 100: 489–523
- Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, Ohta Y, Toshimitsu K, Nakazato Y, Kawasaki K, *et al* (2016) A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 18: 827–838
- Gámez-Chiachio M, Sarrió D & Moreno-Bueno G (2022) Novel Therapies and Strategies to Overcome Resistance to Anti-HER2-Targeted Drugs. *Cancers* 14: 4543
- Garber K (2019) Pursuit of tumor-infiltrating lymphocyte immunotherapy speeds up. *Nature Biotechnology* 37: 969–971
- Garg AD, Dudek AM & Agostinis P (2013) Cancer immunogenicity, danger signals, and DAMPs: What, when, and how? *BioFactors* 39: 355–367
- Gargett T & Brown MP (2014) The inducible caspase-9 suicide gene system as a “safety switch” to limit on-target, off-tumor toxicities of chimeric antigen receptor T cells. *Front Pharmacol* 5
- Geller MA, Cooley S, Judson PL, Ghebre R, Carson LF, Argenta PA, Jonson AL, Panoskaltsis-Mortari A, Curtsinger J, McKenna D, *et al* (2011) A phase II study of allogeneic natural killer cell therapy to treat patients with recurrent ovarian and breast cancer. *Cytotherapy* 13: 98–107
- Genßler S, Burger MC, Zhang C, Oelsner S, Mildenerberger I, Wagner M, Steinbach JP & Wels WS (2015) Dual targeting of glioblastoma with chimeric antigen receptor-engineered natural killer cells overcomes heterogeneity of target antigen expression and enhances antitumor activity and survival. *Oncoimmunology* 5
- Georgopoulou D, Callari M, Rueda OM, Shea A, Martin A, Giovannetti A, Qosaj F, Dariush A, Chin S-F, Carnevalli LS, *et al* (2021) Landscapes of cellular phenotypic diversity in breast cancer xenografts and their impact on drug response. *Nat Commun* 12: 1998
- Gianni L, Eiermann W, Semiglazov V, Lluch A, Tjulandin S, Zambetti M, Moliterni A, Vazquez F, Byakhov MJ, Lichinitser M, *et al* (2014) Neoadjuvant and adjuvant trastuzumab in patients with HER2-positive locally advanced breast cancer (NOAH): follow-up of a randomised controlled superiority trial with a parallel HER2-negative cohort. *The Lancet Oncology* 15: 640–647
- Ginestier C, Adélaïde J, Gonçalves A, Repellini L, Sircoulomb F, Letessier A, Finetti P, Geneix J, Charafe-Jauffret E, Bertucci F, *et al* (2007) ERBB2 phosphorylation and trastuzumab sensitivity of breast cancer cell lines. *Oncogene* 26: 7163–7169
- Gomes RN, Manuel F & Nascimento DS (2021) The bright side of fibroblasts: molecular signature and regenerative cues in major organs. *npj Regen Med* 6: 1–12
- Gong JH, Maki G & Klingemann HG (1994) Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8: 652–658

- Grada Z, Hegde M, Byrd T, Shaffer DR, Ghazi A, Brawley VS, Corder A, Schönfeld K, Koch J, Dotti G, *et al* (2013) TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 2: e105
- Grégoire C, Chasson L, Luci C, Tomasello E, Geissmann F, Vivier E & Walzer T (2007) The trafficking of natural killer cells. *Immunological Reviews* 220: 169–182
- Grimm EA, Mazumder A, Zhang HZ & Rosenberg SA (1982) Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes. *J Exp Med* 155: 1823–1841
- Guedan S, Calderon H, Posey AD & Maus MV (2018) Engineering and Design of Chimeric Antigen Receptors. *Mol Ther Methods Clin Dev* 12: 145–156
- Guerra C, Mijimolle N, Dhawahir A, Dubus P, Barradas M, Serrano M, Campuzano V & Barbacid M (2003) Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* 4: 111–120
- Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NR & Raulet DH (2008) NKG2D-Deficient Mice Are Defective in Tumor Surveillance in Models of Spontaneous Malignancy. *Immunity* 28: 571–580
- Gusterson BA, Gelber RD, Goldhirsch A, Price KN, Säve-Söderborgh J, Anbazhagan R, Styles J, Rudenstam CM, Golouh R & Reed R (1992) Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol* 10: 1049–1056
- Gwalani LA & Orange JS (2018) Single Degranulations in NK Cells Can Mediate Target Cell Killing. *The Journal of Immunology* 200: 3231–3243
- Hall HG, Farson DA & Bissell MJ (1982) Lumen formation by epithelial cell lines in response to collagen overlay: a morphogenetic model in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79: 4672–4676
- Hanahan D (2022) Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery* 12: 31–46
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57–70
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of Cancer: The Next Generation. 29
- Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P, Ruddy K, Tsang J & Cardoso F (2019) Breast cancer. *Nat Rev Dis Primers* 5: 66
- Hatzioannou A, Alissafi T & Verginis P (2017) Myeloid-derived suppressor cells and T regulatory cells in tumors: unraveling the dark side of the force. *Journal of Leukocyte Biology* 102: 407–421
- Haupt Y, Maya R, Kazanietz A & Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387: 296–299
- Hauser WE, Sharma SD & Remington JS (1983) Augmentation of NK cell activity by soluble and particulate fractions of *Toxoplasma gondii*. *The Journal of Immunology* 131: 458–463
- Hawkins ER, D'Souza RR & Klampatsa A (2021) <p>Armored CAR T-Cells: The Next Chapter in T-Cell Cancer Immunotherapy</p>. *BTT* 15: 95–105
- Hennighausen L (2000) Mouse models for breast cancer. *Breast Cancer Res* 2: 2–7
- Herberman RB, Nunn ME, Holden HT & Lavrin DH (1975) Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer* 16: 230–239
- Herbst F, Ball CR, Tuorto F, Nowrouzi A, Wang W, Zavidij O, Dieter SM, Fessler S, van der Hoeven F, Kloz U, *et al* (2012) Extensive Methylation of Promoter Sequences Silences Lentiviral Transgene Expression During Stem Cell Differentiation In Vivo. *Mol Ther* 20: 1014–1021
- Hofer M & Lutolf MP (2021) Engineering organoids. *Nature Reviews Materials* 6: 402–420
- Hoyos V, Savoldo B, Quintarelli C, Mahendravada A, Zhang M, Vera J, Heslop HE, Rooney CM, Brenner MK & Dotti G (2010) Engineering CD19-specific T lymphocytes with interleukin-15 and a suicide gene to enhance their anti-lymphoma/leukemia effects and safety. *Leukemia* 24: 1160–1170
- Hsu H-T, Mace EM, Carisey AF, Viswanath DI, Christakou AE, Wiklund M, Önfelt B & Orange JS (2016) NK cells converge lytic granules to promote cytotoxicity and prevent bystander killing. *J Cell Biol* 215: 875–889
- Huang L, Guo Z, Wang F & Fu L (2021) KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer. *Sig Transduct Target Ther* 6: 1–20

- Huang L, Yang Y, Yang F, Liu S, Zhu Z, Lei Z & Guo J (2018) Functions of EpCAM in physiological processes and diseases (Review). *Int J Mol Med* 42: 1771–1785
- Huang R, Li X, He Y, Zhu W, Gao L, Liu Y, Gao L, Wen Q, Zhong JF, Zhang C, *et al* (2020) Recent advances in CAR-T cell engineering. *J Hematol Oncol* 13
- Hübner J, Katalinic A, Waldmann A & Kraywinkel K (2020) Long-term Incidence and Mortality Trends for Breast Cancer in Germany. *Geburtshilfe Frauenheilkd* 80: 611–618
- Hughes CS, Postovit LM & Lajoie GA (2010) Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *PROTEOMICS* 10: 1886–1890
- Hynds RE, Bonfanti P & Janes SM (2018) Regenerating human epithelia with cultured stem cells: feeder cells, organoids and beyond. *EMBO Mol Med* 10: 139–150
- Ichise H, Tsukamoto S, Hirashima T, Konishi Y, Oki C, Tsukiji S, Iwano S, Miyawaki A, Sumiyama K, Terai K, *et al* (2022) Functional visualization of NK cell-mediated killing of metastatic single tumor cells. *eLife* 11: e76269
- Ilić D, Almeida EAC, Schlaepfer DD, Dazin P, Aizawa S & Damsky CH (1998) Extracellular Matrix Survival Signals Transduced by Focal Adhesion Kinase Suppress p53-mediated Apoptosis. *The Journal of Cell Biology* 143: 547
- Iliopoulou EG, Kountourakis P, Karamouzis MV, Doufexis D, Ardavanis A, Baxevanis CN, Rigatos G, Papamichail M & Perez SA (2010) A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59: 1781–1789
- Ilyas S & Yang JC (2015) Landscape of Tumor Antigens in T-Cell Immunotherapy. *J Immunol* 195: 5117–5122
- Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, *et al* (2015) Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. *Oncology Reports* 33: 1837–1843
- Incassati A, Chandramouli A, Eelkema R & Cowin P (2010) Key signaling nodes in mammary gland development and cancer:  $\beta$ -catenin. *Breast Cancer Research* 12: 213
- Inman JL, Robertson C, Mott JD & Bissell MJ (2015) Mammary gland development: cell fate specification, stem cells and the microenvironment. *Development* 142: 1028–1042
- Itzhaki O, Hovav E, Ziporen Y, Levy D, Kubi A, Zikich D, Hershkovits L, Treves AJ, Shalmon B, Zippel D, *et al* (2011) Establishment and Large-scale Expansion of Minimally... : *Journal of Immunotherapy. Journal of Immunotherapy* 34: 212–220
- Jacobs N, Langers, Renoux, Thiry, & Delvenne (2012) Natural killer cells: role in local tumor growth and metastasis. *BTT*: 73
- Jacobs R, Hintzen G, Kemper A, Beul K, Kempf S, Behrens G, Sykora K-W & Schmidt RE (2001) CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells. *European Journal of Immunology* 31: 3121–3126
- Jaeger BN & Vivier E (2012) When NK cells overcome their lack of education. *J Clin Invest* 122: 3053–3056
- Jaggupilli A & Elkord E (2012) Significance of CD44 and CD24 as Cancer Stem Cell Markers: An Enduring Ambiguity. *Clinical and Developmental Immunology* 2012: 1–11
- James AM, Hsu H-T, Dongre P, Uzel G, Mace EM, Banerjee PP & Orange JS (2013) Rapid activation receptor- or IL-2-induced lytic granule convergence in human natural killer cells requires Src, but not downstream signaling. *Blood* 121: 2627–2637
- Jayaraman J, Mellody MP, Hou AJ, Desai RP, Fung AW, Pham AHT, Chen YY & Zhao W (2020) CAR-T design: Elements and their synergistic function. *EBioMedicine* 58
- Jeffrey S (2005) Molecular distinctions among ERBB2-overexpressing breast cancers. *Breast Cancer Research* 7: S.22
- Jernström S, Hongisto V, Leivonen S-K, Due EU, Tadele DS, Edgren H, Kallioniemi O, Perälä M, Mælandsmo GM & Sahlberg KK (2017) Drug-screening and genomic analyses of HER2-positive breast cancer cell lines reveal predictors for treatment response. *Breast Cancer (Dove Med Press)* 9: 185–198



- Jiang H, Zhang W, Shang P, Zhang H, Fu W, Ye F, Zeng T, Huang H, Zhang X, Sun W, *et al* (2014) Transfection of chimeric anti-CD138 gene enhances natural killer cell activation and killing of multiple myeloma cells. *Mol Oncol* 8: 297–310
- Jin H & Kim HJ (2021) NK Cells Lose Their Cytotoxicity Function against Cancer Stem Cell-Rich Radiotherapy-Resistant Breast Cancer Cell Populations. *Int J Mol Sci* 22: 9639
- Jin J, Gkitsas N, Fellowes VS, Ren J, Feldman SA, Hinrichs CS, Stroncek DF & Highfill SL (2018) Enhanced clinical-scale manufacturing of TCR transduced T-cells using closed culture system modules. *J Transl Med* 16: 13
- Jolly MK, Jia D, Boareto M, Mani SA, Pienta KJ, Ben-Jacob E & Levine H (2015) Coupling the modules of EMT and stemness: A tunable ‘stemness window’ model. *Oncotarget* 6: 25161–25174
- Jones BS, Lamb LS, Goldman F & Di Stasi A (2014) Improving the safety of cell therapy products by suicide gene transfer. *Front Pharmacol* 5
- Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3: 415–428
- Jonkers J, Meuwissen R, van der Gulden H, Peterse H, van der Valk M & Berns A (2001) Synergistic tumor suppressor activity of BRCA2 and p53 in a conditional mouse model for breast cancer. *Nat Genet* 29: 418–425
- Joshi PA, Di Grappa MA & Khokha R (2012) Active allies: hormones, stem cells and the niche in adult mammapoiesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 23: 299–309
- Jost S, Lucar O, Yoder T, Kroll K, Sugawara S, Smith S, Jones R, Tweet G, Werner A, Tomezsko PJ, *et al* (2020) Human antigen-specific memory natural killer cell responses develop against HIV-1 and influenza virus and are dependent on MHC-E restriction. *bioRxiv*: 2020.11.09.374348
- Juengpanich S, Shi L, Iranmanesh Y, Chen J, Cheng Z, Khoo A, Pan L, Wang Y & Cai X (2019) The role of natural killer cells in hepatocellular carcinoma development and treatment: A narrative review. *Translational oncology* 12: 1092–1107
- Kalluri R & Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119: 1420–1428
- Kalos M, Levine BL, Porter DL, Katz S, Grupp SA, Bagg A & June CH (2011) T Cells with Chimeric Antigen Receptors Have Potent Antitumor Effects and Can Establish Memory in Patients with Advanced Leukemia. *Science Translational Medicine* 3: 95ra73-95ra73
- Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P & Starosławska E (2015) Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny* 14: 196–202
- Kamiya T, Seow SV, Wong D, Robinson M & Campana D (2019) Blocking expression of inhibitory receptor NKG2A overcomes tumor resistance to NK cells.
- Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi Y-L, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, *et al* (2009) Molecular Profiling of Breast Cancer Cell Lines Defines Relevant Tumor Models and Provides a Resource for Cancer Gene Discovery. *PLoS One* 4
- Karlsson H, Fryknäs M, Larsson R & Nygren P (2012) Loss of cancer drug activity in colon cancer HCT-116 cells during spheroid formation in a new 3-D spheroid cell culture system. *Experimental Cell Research* 318: 1577–1585
- Kärre K, Ljunggren HG, Piontek G & Kiessling R (1986) Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319: 675–678
- Kashfi SMH, Almozayan S, Jinks N, Koo B-K & Nateri AS (2018) Morphological alterations of cultured human colorectal matched tumour and healthy organoids. *Oncotarget* 9: 10572–10584
- Kawaguchi Y, Kono K, Mizukami Y, Mimura K & Fujii H (2009) Mechanisms of Escape from Trastuzumab-mediated ADCC in Esophageal Squamous Cell Carcinoma: Relation to Susceptibility to Perforin-granzyme. *Anticancer Research* 29: 2137–2146
- Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K & Yagita H (1999) Expression and Function of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand on Murine Activated NK Cells. *The Journal of Immunology* 163: 1906–1913
- Kerr WG (2011) Inhibitor and activator: dual functions for SHIP in immunity and cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1217: 1–17

- Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, Wang G, Eshhar Z, Mavroukakis SA, White DE, Wunderlich JR, Canevari S, Rogers-Freezer L, *et al* (2006) A Phase I Study on Adoptive Immunotherapy Using Gene-Modified T Cells for Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res* 12: 6106–6115
- Khalaf K, Hana D, Chou JT-T, Singh C, Mackiewicz A & Kaczmarek M (2021) Aspects of the Tumor Microenvironment Involved in Immune Resistance and Drug Resistance. *Frontiers in Immunology* 12
- Kiessling R, Klein E, Pross H & Wigzell H (1975) 'Natural' killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 5: 117–121
- Kim J, Koo B-K & Knoblich JA (2020) Human organoids: model systems for human biology and medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21: 571–584
- Kim K-M, Lee K, Hong Y-S & Park H-Y (2000) Fas-mediated apoptosis and expression of related genes in human malignant hematopoietic cells. *Exp Mol Med* 32: 246–254
- Kim M, Rhee J-K, Choi H, Kwon A, Kim J, Lee GD, Jekarl DW, Lee S, Kim Y & Kim T-M (2017) Passage-dependent accumulation of somatic mutations in mesenchymal stromal cells during in vitro culture revealed by whole genome sequencing. *Sci Rep* 7
- Kim M-J, Kim H-B, Bae J-H, Lee J-W, Park S-J, Kim D-W, Park S-I, Kang C-D & Kim S-H (2009) Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting the DNA-PKcs/Akt-mediated cell survival pathway. *Biochemical Pharmacology* 78: 573–582
- Kim S, Poursine-Laurent J, Truscott SM, Lybarger L, Song Y-J, Yang L, French AR, Sunwoo JB, Lemieux S, Hansen TH, *et al* (2005) Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 436: 709–713
- Klichinsky M, Ruella M, Shestova O, Lu XM, Best A, Zeeman M, Schmierer M, Gabrusiewicz K, Anderson NR, Petty NE, *et al* (2020) Human chimeric antigen receptor macrophages for cancer immunotherapy. *Nat Biotechnol* 38: 947–953
- Klingemann H, Boissel L & Toneguzzo F (2016) Natural Killer Cells for Immunotherapy – Advantages of the NK-92 Cell Line over Blood NK Cells. *Front Immunol* 7
- Klingemann HG, Wong E & Maki G (1996) A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2: 68–75
- Kloess S, Kretschmer A, Stahl L, Fricke S & Koehl U (2019) CAR-Expressing Natural Killer Cells for Cancer Retargeting. *TMH* 46: 4–13
- Knorr DA, Ni Z, Hermanson D, Hexum MK, Bendzick L, Cooper LNJ, Lee DA & Kaufman DS (2013) Clinical-Scale Derivation of Natural Killer Cells From Human Pluripotent Stem Cells for Cancer Therapy. *Stem Cells Transl Med* 2: 274–283
- Ko H, Kim S, Jin C-H, Lee E, Ham S, Yook JI & Kim K (2012) Protein Kinase Casein Kinase 2-Mediated Upregulation of N-Cadherin Confers Anoikis Resistance on Esophageal Carcinoma Cells. *Molecular Cancer Research* 10: 1032–1038
- Kordon EC & Smith GH (1998) An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development* 125: 1921–1930
- Kretschmar K (2021) Cancer research using organoid technology. *J Mol Med* 99: 501–515
- Kretschmar K & Clevers H (2016) Organoids: Modeling Development and the Stem Cell Niche in a Dish. *Developmental Cell* 38: 590–600
- Kröger C, Afeyan A, Mraz J, Eaton EN, Reinhardt F, Khodor YL, Thiru P, Bieri B, Ye X, Burge CB, *et al* (2019) Acquisition of a hybrid E/M state is essential for tumorigenicity of basal breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116: 7353–7362
- Kruse PH, Matta J, Ugolini S & Vivier E (2014) Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunology & Cell Biology* 92: 221–229
- Krzewski K & Coligan JE (2012) Human NK cell lytic granules and regulation of their exocytosis. *Front Immunol* 3
- Kuchenbaecker KB, Hopper JL, Barnes DR, Phillips K-A, Mooij TM, Roos-Blom M-J, Jervis S, van Leeuwen FE, Milne RL, Andrieu N, *et al* (2017) Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA* 317: 2402



- Kueberuwa G, Kalaitidou M, Cheadle E, Hawkins RE & Gilham DE (2018) CD19 CAR T Cells Expressing IL-12 Eradicate Lymphoma in Fully Lymphoreplete Mice through Induction of Host Immunity. *Molecular Therapy - Oncolytics* 8: 41–51
- Kurokawa H, Lenferink AEG, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT & Arteaga CL (2000) Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and Mitogen-activated Protein Kinases Enhances Tamoxifen Action against HER2-overexpressing, Tamoxifen-resistant Breast Cancer Cells. *Cancer Research* 60: 5887–5894
- Kyuno D, Takasawa A, Kikuchi S, Takemasa I, Osanai M & Kojima T (2021) Role of tight junctions in the epithelial-to-mesenchymal transition of cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1863: 183503
- Labani-Motlagh A, Ashja-Mahdavi M & Loskog A (2020) The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Front Immunol* 11: 940
- Lambert AW, Ozturk S & Thiagalingam S (2012) Integrin Signaling in Mammary Epithelial Cells and Breast Cancer. *ISRN Oncol* 2012: 493283
- Lamouille S, Xu J & Derynck R (2014) Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 178–196
- Lancaster MA & Knoblich JA (2014) Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science* 345: 1247125
- Langlands FE, Horgan K, Dodwell DD & Smith L (2013) Breast cancer subtypes: response to radiotherapy and potential radiosensitisation. *BJR* 86: 20120601
- Lanier LL (2001) On guard—activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2: 23–27
- Lanier LL (2005) NK CELL RECOGNITION. *Annu Rev Immunol* 23: 225–274
- Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9: 495–502
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR & Phillips JH (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136: 4480–4486
- Laskay T, Röllinghoff M & Solbach W (1993) Natural killer cells participate in the early defense against Leishmania major infection in mice. *Eur J Immunol* 23: 2237–2241
- Lawrence MS, Stojanov P, Polak P, Kryukov GV, Cibulskis K, Sivachenko A, Carter SL, Stewart C, Mermel CH, Roberts SA, et al (2013) Mutational heterogeneity in cancer and the search for new cancer-associated genes. *Nature* 499: 214–218
- Lee JL & Streuli CH (2014) Integrins and epithelial cell polarity. *J Cell Sci* 127: 3217–3225
- Levi-Schaffer F (2018) Inhibitory and Coactivating Receptors Recognising the Same Ligand: Immune Homeostasis Exploited by Pathogens and Tumours. 11
- Li L, Zhang D, Liu B, Lv D, Zhai J, Guan X, Yi Z & Ma F (2022) Antibody-drug conjugates in HER2-positive breast cancer. *Chin Med J (Engl)* 135: 261–267
- Li P, Katirai F, Zheng F & Gong F (2011) Recycling and reutilization of cytotoxic molecules, a new type of energy conservation of NK cells? *Medical Hypotheses* 76: 293–295
- Li Y, Hermanson DL, Moriarty BS & Kaufman DS (2018) Human iPSC-derived Natural Killer Cells Engineered with Chimeric Antigen Receptors Enhance Anti-Tumor Activity. *Cell Stem Cell* 23: 181-192.e5
- Li Y, Macdonald-Obermann J, Westfall C, Piwnica-Worms D & Pike LJ (2012) Quantitation of the Effect of ErbB2 on Epidermal Growth Factor Receptor Binding and Dimerization. *J Biol Chem* 287: 31116–31125
- Li Y, Raffo AJ, Drew L, Mao Y, Tran A, Petrylak DP & Fine RL (2003) Fas-Mediated Apoptosis Is Dependent on Wild-Type p53 Status in Human Cancer Cells Expressing a Temperature-Sensitive p53 Mutant Alanine-1431. *Cancer Research* 63: 1527–1533
- Li Z, Tognon CE, Godinho FJ, Yasaitis L, Hock H, Herschkowitz JI, Lannon CL, Cho E, Kim S-J, Bronson RT, et al (2007) ETV6-NTRK3 Fusion Oncogene Initiates Breast Cancer from Committed Mammary Progenitors via Activation of AP1 Complex. *Cancer Cell* 12: 542–558

- Lieberman J (2003) The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3: 361–370
- Lister J, Rybka WB, Donnenberg AD, deMagalhaes-Silverman M, Pincus SM, Bloom EJ, Elder EM, Ball ED & Whiteside TL (1995) Autologous peripheral blood stem cell transplantation and adoptive immunotherapy with activated natural killer cells in the immediate posttransplant period. *Clin Cancer Res* 1: 607–614
- Liu D, Xu L, Yang F, Li D, Gong F & Xu T (2005) Rapid biogenesis and sensitization of secretory lysosomes in NK cells mediated by target-cell recognition. *PNAS* 102: 123–127
- Liu E, Marin D, Banerjee P, Macapinlac HA, Thompson P, Basar R, Kerbauy LN, Overman B, Thall P, Kaplan M, *et al* (2020) Use of CAR-Transduced Natural Killer Cells in CD19-Positive Lymphoid Tumors. *New England Journal of Medicine*
- Liu L, Yu L, Li Z, Li W & Huang W (2021a) Patient-derived organoid (PDO) platforms to facilitate clinical decision making. *Journal of Translational Medicine* 19: 40
- Liu S, Galat V, Galat Y, Lee YKA, Wainwright D & Wu J (2021b) NK cell-based cancer immunotherapy: from basic biology to clinical development. *Journal of Hematology & Oncology* 14: 7
- Liu Z, Meng X, Tang X, Zou W & He Y (2022) Intratumoral tertiary lymphoid structures promote patient survival and immunotherapy response in head neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*
- Ljunggren HG, Ohlén C, Höglund P, Yamasaki T, Klein G & Kärre K (1988) Afferent and efferent cellular interactions in natural resistance directed against MHC class I deficient tumor grafts. 9
- Llames S, García-Pérez E, Meana Á, Larcher F & del Río M (2015) Feeder Layer Cell Actions and Applications. *Tissue Eng Part B Rev* 21: 345–353
- Loh C-Y, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP & Looi CY (2019) The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells* 8: 1118
- Long EO, Kim HS, Liu D, Peterson ME & Rajagopalan S (2013) Controlling NK Cell Responses: Integration of Signals for Activation and Inhibition. *Annu Rev Immunol* 31
- Lopes-Ramos CM, Paulson JN, Chen C-Y, Kuijjer ML, Fagny M, Platig J, Sonawane AR, DeMeo DL, Quackenbush J & Glass K (2017) Regulatory network changes between cell lines and their tissues of origin. *BMC Genomics* 18
- Lühr I, Friedl A, Overath T, Tholey A, Kunze T, Hilpert F, Sebens S, Arnold N, Rösel F, Oberg H-H, *et al* (2012) Mammary fibroblasts regulate morphogenesis of normal and tumorigenic breast epithelial cells by mechanical and paracrine signals. *Cancer Letters* 325: 175–188
- Ma M, Badeti S, Geng K & Liu D (2020) Efficacy of Targeting SARS-CoV-2 by CAR-NK Cells Immunology
- Mackensen A, Müller F, Mougiakakos D, Böltz S, Wilhelm A, Aigner M, Völkl S, Simon D, Kleyer A, Munoz L, *et al* (2022) Anti-CD19 CAR T cell therapy for refractory systemic lupus erythematosus. *Nat Med* 28: 2124–2132
- Maki G, Klingemann HG, Martinson JA & Tam YK (2001) Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 10: 369–383
- Maldini C, Ellis G & Riley JL (2018) CAR T cells for infection, autoimmunity and allotransplantation. *Nat Rev Immunol* 18: 605–616
- Malkin D (2011) Li-Fraumeni Syndrome. *Genes Cancer* 2: 475–484
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P & Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in Immunology* 23: 549–555
- Mariotti LG, Pirovano G, Savage KI, Ghita M, Ottolenghi A, Prise KM & Schettino G (2013) Use of the  $\gamma$ -H2AX Assay to Investigate DNA Repair Dynamics Following Multiple Radiation Exposures. *PLoS One* 8: e79541
- Mark C, Czerwinski T, Roessner S, Mainka A, Hörsch F, Heublein L, Winterl A, Sanokowski S, Richter S, Bauer N, *et al* (2020) Cryopreservation impairs 3-D migration and cytotoxicity of natural killer cells. *Nat Commun* 11: 5224
- Mattiola I (2021) Immune Circuits to Shape Natural Killer Cells in Cancer. *Cancers (Basel)* 13: 3225

- Maurer-Gebhard M, Schmidt M & Azemar M (1998) Systemic Treatment with a Recombinant erbB-2 Receptor-specific Tumor Toxin Efficiently Reduces Pulmonary Metastases in Mice Injected with Genetically Modified Carcinoma Cells. *8*
- Maykel J, Liu JH, Li H, Shultz LD, Greiner DL & Houghton J (2014) NOD-scidIl2rgtm1Wjl and NOD-Rag1nullIl2rgtm1Wjl: A Model for Stromal Cell–Tumor Cell Interaction for Human Colon Cancer. *Dig Dis Sci* 59: 1169–1179
- Mehta RS, Randolph B, Daher M & Rezvani K (2018) NK cell therapy for hematologic malignancies. *Int J Hematol* 107: 262–270
- Mentlik AN, Sanborn KB, Holzbaur EL & Orange JS (2010) Rapid Lytic Granule Convergence to the MTOC in Natural Killer Cells Is Dependent on Dynein But Not Cytolytic Commitment. *MBoC* 21: 2241–2256
- Michel T, Hentges F & Zimmer J (2013) Consequences of the crosstalk between monocytes/macrophages and natural killer cells. *Front Immunol* 3
- Mikaelian I, Hovick M, Silva KA, Burzenski LM, Shultz LD, Ackert-Bicknell CL, Cox GA & Sundberg JP (2006) Expression of Terminal Differentiation Proteins Defines Stages of Mouse Mammary Gland Development. *Vet Pathol* 43: 36–49
- Miller JS, Soignier Y, Panoskaltsis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK, McKenna D, Le C, Defor TE, Burns LJ, *et al* (2005) Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 105: 3051–3057
- Mohty B & Mohty M (2011) Long-term complications and side effects after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: an update. *Blood Cancer J* 1: e16
- Moretta A (2005) The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 17: 306–311
- Moretta L, Locatelli F, Pende D, Marcenaro E, Mingari MC & Moretta A (2011) Killer Ig-like receptor-mediated control of natural killer cell alloreactivity in haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117: 764–771
- Moretta L & Moretta A (2004) Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 23: 255–259
- Morgan RA, Yang JC, Kitano M, Dudley ME, Laurencot CM & Rosenberg SA (2010) Case Report of a Serious Adverse Event Following the Administration of T Cells Transduced With a Chimeric Antigen Receptor Recognizing ERBB2. *Molecular Therapy* 18: 843–851
- Morvan MG & Lanier LL (2016) NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat Rev Cancer* 16: 7–19
- Mosser DM, Hamidzadeh K & Goncalves R (2021) Macrophages and the maintenance of homeostasis. *Cell Mol Immunol* 18: 579–587
- Mouriaux F, Zaniolo K, Bergeron M-A, Weidmann C, De La Fouchardière A, Fournier F, Droit A, Morcos MW, Landreville S & Guérin SL (2016) Effects of Long-term Serial Passaging on the Characteristics and Properties of Cell Lines Derived From Uveal Melanoma Primary Tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57: 5288
- Mroue R & Bissell MJ (2013) Three-Dimensional Cultures of Mouse Mammary Epithelial Cells. *Methods Mol Biol* 945: 221–250
- Mrozik KM, Blaschuk OW, Cheong CM, Zannettino ACW & Vandyke K (2018) N-cadherin in cancer metastasis, its emerging role in haematological malignancies and potential as a therapeutic target in cancer. *BMC Cancer* 18: 939
- Mu W, Carrillo MA & Kitchen SG (2020) Engineering CAR T Cells to Target the HIV Reservoir. *Front Cell Infect Microbiol* 10
- Mukhopadhyay M (2020) Macrophages enter CAR immunotherapy. *Nat Methods* 17: 559–559
- Müller T, Uherek C, Maki G, Chow KU, Schimpf A, Klingemann H-G, Tonn T & Wels WS (2008) Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 57: 411–423

- Murayama T & Gotoh N (2019) Patient-Derived Xenograft Models of Breast Cancer and Their Application. *Cells* 8
- Myers MB, Banda M, McKim KL, Wang Y, Powell MJ & Parsons BL (2016) Breast Cancer Heterogeneity Examined by High-Sensitivity Quantification of PIK3CA, KRAS, HRAS, and BRAF Mutations in Normal Breast and Ductal Carcinomas. *Neoplasia* 18: 253–263
- Nagy JA, Chang S-H, Dvorak AM & Dvorak HF (2009) Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know? *Br J Cancer* 100: 865–869
- Nakahata K, Simons BW, Pozzo E, Shuck R, Kurenbekova L, Prudowsky Z, Dholakia K, Coarfa C, Patel TD, Donehower LA, *et al* (2022) K-Ras and p53 mouse model with molecular characteristics of human rhabdomyosarcoma and translational applications. *Dis Model Mech* 15: dmm049004
- Nestor CE, Ottaviano R, Reinhardt D, Cruickshanks HA, Mjoseng HK, McPherson RC, Lentini A, Thomson JP, Dunican DS, Pennings S, *et al* (2015) Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture systems. *Genome Biology* 16: 11
- Netter P, Anft M & Watzl C (2017) Termination of the Activating NK Cell Immunological Synapse Is an Active and Regulated Process. *The Journal of Immunology* 199: 2528–2535
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe J-P, Tong F, *et al* (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10: 515–527
- Neve RM, Lane HA & Hynes NE (2001) The role of overexpressed HER2 in transformation. *Annals of Oncology* 12: S9–S13
- Nie Q (2018) Stem cells: a window of opportunity in low-dimensional EMT space. *Oncotarget* 9: 31790–31791
- Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query. [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) (accessed 12.02.22).
- O'Dell MR, Huang J-L, Whitney-Miller CL, Deshpande V, Rothberg P, Grose V, Rossi RM, Zhu AX, Land H, Bardeesy N, *et al* (2012) KrasG12D and p53 mutation cause primary intra-hepatic cholangiocarcinoma. *Cancer Res* 72: 1557–1567
- Oelsner S, Friede ME, Zhang C, Wagner J, Badura S, Bader P, Ullrich E, Ottmann OG, Klingemann H, Tonn T, *et al* (2017) Continuously expanding CAR NK-92 cells display selective cytotoxicity against B-cell leukemia and lymphoma. *Cytotherapy* 19: 235–249
- Oelsner S, Waldmann A, Billmeier A, Röder J, Lindner A, Ullrich E, Marschalek R, Dotti G, Jung G, Große-Hovest L, *et al* (2019) Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit in vivo leukemia growth. *International Journal of Cancer* 145: 1935–1945
- Olayioye MA (2001) Intracellular signaling pathways of ErbB2/HER-2 and family members. *Breast Cancer Research* 3: 385
- Orange JS (2008) Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse. *Nat Rev Immunol* 8: 713–725
- Ostroumov D, Fekete-Drimusz N, Saborowski M, Kühnel F & Woller N (2018) CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell Mol Life Sci* 75: 689–713
- Paavolainen O & Peuhu E (2021) Integrin-mediated adhesion and mechanosensing in the mammary gland. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 114: 113–125
- Pardoll DM (2015) Distinct Mechanisms of Tumor Resistance to NK Killing: Of Mice and Men. *Immunity* 42: 605–606
- Parekh A, Das S, Parida S, Das CK, Dutta D, Mallick SK, Wu P-H, Kumar BNP, Bharti R, Dey G, *et al* (2018) Multi-nucleated cells use ROS to induce breast cancer chemo-resistance in vitro and in vivo. *Oncogene* 37: 4546–4561
- Park JR, DiGiusto DL, Slovak M, Wright C, Naranjo A, Wagner J, Meechoovent HB, Bautista C, Chang W-C, Ostberg JR, *et al* (2007) Adoptive Transfer of Chimeric Antigen Receptor Re-directed Cytolytic T Lymphocyte Clones in Patients with Neuroblastoma. *Molecular Therapy* 15: 825–833

- Paszkievicz PJ, Fräßle SP, Srivastava S, Sommermeyer D, Hudecek M, Drexler I, Sadelain M, Liu L, Jensen MC, Riddell SR, *et al* (2016) Targeted antibody-mediated depletion of murine CD19 CAR T cells permanently reverses B cell aplasia. *J Clin Invest* 126: 4262–4272
- Paul S & Lal G (2017) The Molecular Mechanism of Natural Killer Cells Function and Its Importance in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol* 8
- Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A, Sailer V, Augello M, Puca L, Rosati R, *et al* (2017) Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discovery* 7: 462–477
- Pećina-Šlaus N (2003) Tumor suppressor gene E-cadherin and its role in normal and malignant cells. *Cancer Cell Int* 3: 17
- Pende D, Castriconi R, Romagnani P, Spaggiari GM, Marcenaro S, Dondero A, Lazzeri E, Lasagni L, Martini S, Rivera P, *et al* (2006) Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction. *Blood* 107: 2030–2036
- Pende D, Falco M, Vitale M, Cantoni C, Vitale C, Munari E, Bertaina A, Moretta F, Del Zotto G, Pietra G, *et al* (2019) Killer Ig-Like Receptors (KIRs): Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation. *Front Immunol* 10
- Perez-Oquendo M & Gibbons DL (2022) Regulation of ZEB1 Function and Molecular Associations in Tumor Progression and Metastasis. *Cancers* 14: 1864
- Perou CM, Sørbye T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, *et al* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406: 747–752
- Pickl M & Ries CH (2009) Comparison of 3D and 2D tumor models reveals enhanced HER2 activation in 3D associated with an increased response to trastuzumab. *Oncogene* 28: 461–468
- Pitot HC (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 72: 962–970
- Platonova S, Cherfils-Vicini J, Damotte D, Crozet L, Vieillard V, Validire P, André P, Dieu-Nosjean M-C, Alifano M, Régnard J-F, *et al* (2011) Profound Coordinated Alterations of Intratumoral NK Cell Phenotype and Function in Lung Carcinoma. *Cancer Research* 71: 5412–5422
- Pohlmann PR, Mayer IA & Mernaugh R (2009) Resistance to Trastuzumab in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 15: 7479–7491
- Poli A, Michel T, Thérésine M, Andrès E, Hentges F & Zimmer J (2009) CD56bright natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology* 126: 458–465
- Ponterio E, De Maria R & Haas TL (2020) Identification of Targets to Redirect CAR T Cells in Glioblastoma and Colorectal Cancer: An Arduous Venture. *Frontiers in Immunology* 11
- Prager I, Liesche C, van Ooijen H, Urlaub D, Verron Q, Sandström N, Fasbender F, Claus M, Eils R, Beaudouin J, *et al* (2019) NK cells switch from granzyme B to death receptor-mediated cytotoxicity during serial killing. *J Exp Med* 216: 2113–2127
- Prager I & Watzl C (2019) Mechanisms of natural killer cell-mediated cellular cytotoxicity. *Journal of Leukocyte Biology* 105: 1319–1329
- Pule MA, Savoldo B, Myers GD, Rossig C, Russell HV, Dotti G, Huls MH, Liu E, Gee AP, Mei Z, *et al* (2008) Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* 14: 1264–1270
- Qin SS, Melucci AD, Chacon AC & Prieto PA (2021) Adoptive T Cell Therapy for Solid Tumors: Pathway to Personalized Standard of Care. *Cells* 10: 808
- Ran G he, Lin Y qing, Tian L, Zhang T, Yan D mei, Yu J hua & Deng Y cai (2022) Natural killer cell homing and trafficking in tissues and tumors: from biology to application. *Sig Transduct Target Ther* 7: 1–21
- Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W & Jung H (2013) Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 31: 413–441
- Raulet DH & Vance RE (2006) Self-tolerance of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 6: 520–531
- Raulet DH, Vance RE & McMahon CW (2001) Regulation of the Natural Killer Cell Receptor Repertoire. *Annu Rev Immunol* 19: 291–330
- Ravetch JV & Lanier LL (2000) Immune Inhibitory Receptors. *290*: 7



- Raymond K, Faraldo MM, Deugnier M-A & Glukhova MA (2012) Integrins in mammary development. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23: 599–605
- Redondo PA, Pavlou M, Loizidou M & Cheema U (2017) Elements of the niche for adult stem cell expansion. *J Tissue Eng* 8: 2041731417725464
- Reim F, Dombrowski Y, Ritter C, Buttman M, Häusler S, Ossadnik M, Krockenberger M, Beier D, Beier CP, Dietl J, *et al* (2009) Immunoselection of Breast and Ovarian Cancer Cells with Trastuzumab and Natural Killer Cells: Selective Escape of CD44high/CD24low/HER2low Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 69: 8058–8066
- Relander T, Brun ACM, Olsson K, Pedersen L & Richter J (2002) Overexpression of Gibbon Ape Leukemia Virus (GALV) Receptor (GLVR1) on Human CD34+ Cells Increases Gene Transfer Mediated by GALV Pseudotyped Vectors. *Molecular Therapy* 6: 400–406
- Ribatti D, Tamma R & Annese T (2020) Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol* 13: 100773
- Ridge KM, Eriksson JE, Pekny M & Goldman RD (2022) Roles of vimentin in health and disease. *Genes Dev* 36: 391–407
- Rier HN, Levin M, van Rosmalen J, Bos MEM, Drooger JC, de Jong P, Portielje JEA, Elsten EMP, Ten Tije A, Sleijfer S, *et al* (2017) First-Line Palliative HER2-Targeted Therapy in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer Is Less Effective After Previous Adjuvant Trastuzumab-Based Therapy. *Oncologist* 22: 901–909
- Rodella L (1998) Apoptosis induced by NK cells is modulated by the NK-active cytokines IL-2 and IL-12. *International Immunology* 10: 719–725
- Romagnoli M, Cagnet S, Chiche A, Bresson L, Baulande S, de la Grange P, De Arcangelis A, Kreft M, George-Labouesse E, Sonnenberg A, *et al* (2019) Deciphering the Mammary Stem Cell Niche: A Role for Laminin-Binding Integrins. *Stem Cell Reports* 12: 831–844
- Rosenberg S, Spiess P & Lafreniere R (1986) A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318–1321
- Rosenberg SA, Aebersold P, Cornetta K, Kasid A, Morgan RA, Moen R, Karson EM, Lotze MT, Yang JC, Topalian SL, *et al* (1990) Gene Transfer into Humans — Immunotherapy of Patients with Advanced Melanoma, Using Tumor-Infiltrating Lymphocytes Modified by Retroviral Gene Transduction. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199008303230904>
- Rosenberg SA, Yang JC, Sherry RM, Kammula US, Hughes MS, Phan GQ, Citrin DE, Restifo NP, Robbins PF, Wunderlich JR, *et al* (2011) Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res* 17: 4550–4557
- Rosenberg SA, Yang JC, White DE & Steinberg SM (1998) Durability of complete responses in patients with metastatic cancer treated with high-dose interleukin-2: identification of the antigens mediating response. *Ann Surg* 228: 307–319
- Rosenbluth JM, Schackmann RCJ, Gray GK, Selfors LM, Li CM-C, Boedicker M, Kuiken HJ, Richardson A, Brock J, Garber J, *et al* (2020) Organoid cultures from normal and cancer-prone human breast tissues preserve complex epithelial lineages. *Nat Commun* 11: 1711
- Rosigkeit S, Kruchem M, Thies D, Kreft A, Eichler E, Boegel S, Jansky S, Siegl D, Kaps L, Pickert G, *et al* (2021) Definitive evidence for Club cells as progenitors for mutant Kras/Trp53-deficient lung cancer. *International Journal of Cancer* 149: 1670–1682
- Rouce RH, Shaim H, Sekine T, Weber G, Ballard B, Ku S, Barese C, Murali V, Wu M-F, Liu H, *et al* (2016) The TGF- $\beta$ /SMAD pathway is an important mechanism for NK cell immune evasion in childhood B acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 30: 800–811
- Rubin H (2002) The disparity between human cell senescence in vitro and lifelong replication in vivo. *Nat Biotechnol* 20: 675–681
- Rubnitz JE, Inaba H, Kang G, Gan K, Hartford C, Triplett BM, Dallas M, Shook D, Gruber T, Pui C-H, *et al* (2015) Natural Killer Cell Therapy in Children with Relapsed Leukemia. *Pediatr Blood Cancer* 62: 1468–1472

- Ruggeri L, Capanni M, Casucci M, Volpi I, Tosti A, Perruccio K, Urbani E, Negrin RS, Martelli MF & Velardi A (1999) Role of Natural Killer Cell Alloreactivity in HLA-Mismatched Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Blood* 94: 333–339
- Ruggeri L, Capanni M, Urbani E, Perruccio K, Shlomchik WD, Tosti A, Posati S, Rogaia D, Frassoni F, Aversa F, *et al* (2002) Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* 295: 2097–2100
- Ruggeri L, Parisi S, Urbani E & Curti A (2015) Alloreactive Natural Killer Cells for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia: From Stem Cell Transplantation to Adoptive Immunotherapy. *Front Immunol* 6
- Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, Balgobind AV, Wind K, Gracanin A, Begthel H, *et al* (2018) A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell* 172: 373–386.e10
- Sachs N, Pappaspyropoulos A, Zomer-van Ommen DD, Heo I, Böttinger L, Klay D, Weeber F, Huelsz-Prince G, Jakobachvili N, Amatngalim GD, *et al* (2019) Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *The EMBO Journal* 38: e100300
- Safa AR (2022) Drug and apoptosis resistance in cancer stem cells: a puzzle with many pieces. *Cancer Drug Resistance* 5: 850–872
- Sahm C, Schönfeld K & Wels WS (2012) Expression of IL-15 in NK cells results in rapid enrichment and selective cytotoxicity of gene-modified effectors that carry a tumor-specific antigen receptor. *Cancer Immunol Immunother* 61: 1451–1461
- Saitoh M (2018) Involvement of partial EMT in cancer progression. *The Journal of Biochemistry* 164: 257–264
- Sallusto F & Lanzavecchia A (2002) The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Research & Therapy* 4: S127
- Salter AI, Ivey RG, Kennedy JJ, Voillet V, Rajan A, Alderman EJ, Voytovich UJ, Lin C, Sommermeyer D, Liu L, *et al* (2018) Phosphoproteomic analysis of chimeric antigen receptor signaling reveals kinetic and quantitative differences that affect cell function. *Sci Signal* 11
- Sánchez-Tilló E, Lázaro A, Torrent R, Cuatrecasas M, Vaquero EC, Castells A, Engel P & Postigo A (2010) ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1. *Oncogene* 29: 3490–3500
- Sato T, Vries RG, Snippert HJ, van de Wetering M, Barker N, Stange DE, van Es JH, Abo A, Kujala P, Peters PJ, *et al* (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature* 459: 262–265
- Saunus JM, Smart CE, Kutasovic JR, Johnston RL, Kalita-de Croft P, Miranda M, Rozali EN, Vargas AC, Reid LE, Lorsy E, *et al* (2018) Multidimensional phenotyping of breast cancer cell lines to guide preclinical research. *Breast Cancer Res Treat* 167: 289–301
- Savoldo B, Ramos CA, Liu E, Mims MP, Keating MJ, Carrum G, Kamble RT, Bollard CM, Gee AP, Mei Z, *et al* (2011) CD28 costimulation improves expansion and persistence of chimeric antigen receptor–modified T cells in lymphoma patients. *J Clin Invest* 121: 1822–1826
- Schafer KA (1998) The cell cycle: a review. *Vet Pathol* 35: 461–478
- Schlam I & Swain SM (2021) HER2-positive breast cancer and tyrosine kinase inhibitors: the time is now. *NPJ Breast Cancer* 7: 56
- Schmiedel D & Mandelboim O (2018) NKG2D Ligands—Critical Targets for Cancer Immune Escape and Therapy. *Front Immunol* 9: 2040
- Schönfeld K, Sahm C, Zhang C, Naundorf S, Brendel C, Odendahl M, Nowakowska P, Bönig H, Köhl U, Kloess S, *et al* (2015) Selective Inhibition of Tumor Growth by Clonal NK Cells Expressing an ErbB2/HER2-Specific Chimeric Antigen Receptor. *Mol Ther* 23: 330–338
- Schubert M-L, Schmitt M, Wang L, Ramos CA, Jordan K, Müller-Tidow C & Dreger P (2021) Side-effect management of chimeric antigen receptor (CAR) T-cell therapy. *Annals of Oncology* 32: 34–48
- Seimetz D, Heller K & Richter J (2019) Approval of First CAR-Ts: Have we Solved all Hurdles for ATMPs? *Cell Med* 11



- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat M-L, Wu L, Lindeman GJ & Visvader JE (2006) Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84–88
- Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Badve S & Nakshatri H (2006) CD44+/CD24-breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 8: R59
- Sherr CJ & Bartek J (2017) Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. *Annual Review of Cancer Biology* 1: 41–57
- Shi F-D, Ljunggren H-G, La Cava A & Van Kaer L (2011) Organ-specific features of natural killer cells. *Nat Rev Immunol* 11: 658–671
- Shibue T & Weinberg RA (2017) EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 611–629
- Simhadri VR, Reiners KS, Hansen HP, Topolar D, Simhadri VL, Nohroudi K, Kufer TA, Engert A & Pogge von Strandmann E (2008) Dendritic Cells Release HLA-B-Associated Transcript-3 Positive Exosomes to Regulate Natural Killer Function. *PLoS One* 3
- Sinha D, Saha P, Samanta A & Bishayee A (2020) Emerging Concepts of Hybrid Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Cancer Progression. *Biomolecules* 10: 1561
- Skrypek N, Goossens S, Smedt ED, Vandamme N & Berx G (2017) Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. *Trends in Genetics* 33: 943–959
- Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, *et al* (2011) Adjuvant Trastuzumab in HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 365: 1273–1283
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, *et al* (2001) Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. *New England Journal of Medicine* 344: 783–792
- Sleeman KE, Kendrick H, Robertson D, Isacke CM, Ashworth A & Smalley MJ (2007) Dissociation of estrogen receptor expression and in vivo stem cell activity in the mammary gland. *Journal of Cell Biology* 176: 19–26
- Sliwkowski MX, Lofgren JA, Lewis GD, Hotaling TE, Fendly BM & Fox JA (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin Oncol* 26: 60–70
- Smith ER, Capo-chichi CD & Xu X-X (2018) Defective Nuclear Lamina in Aneuploidy and Carcinogenesis. *Frontiers in Oncology* 8
- Smith MJ, Neel BG & Ikura M (2013) NMR-based functional profiling of RASopathies and oncogenic RAS mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4574–4579
- Smith SL, Kennedy PR, Stacey KB, Worboys JD, Yarwood A, Seo S, Solloa EH, Mistretta B, Chatterjee SS, Gunaratne P, *et al* (2020) Diversity of peripheral blood human NK cells identified by single-cell RNA sequencing. *Blood Advances* 4: 1388–1406
- Song D-G, Ye Q, Poussin M, Harms GM, Figini M & Powell DJ Jr (2012) CD27 costimulation augments the survival and antitumor activity of redirected human T cells in vivo. *Blood* 119: 696–706
- Sordo-Bahamonde C, Vitale M, Lorenzo-Herrero S, López-Soto A & Gonzalez S (2020) Mechanisms of Resistance to NK Cell Immunotherapy. *Cancers (Basel)* 12: 893
- Stabile H, Fionda C, Gismondi A & Santoni A (2017) Role of Distinct Natural Killer Cell Subsets in Anticancer Response. *Front Immunol* 8
- Stauffer W, Sheng H & Lim HN (2018) EzColocalization: An ImageJ plugin for visualizing and measuring colocalization in cells and organisms. *Sci Rep* 8: 15764
- Stebbins CC, Watzl C, Billadeau DD, Leibson PJ, Burshtyn DN & Long EO (2003) Vav1 Dephosphorylation by the Tyrosine Phosphatase SHP-1 as a Mechanism for Inhibition of Cellular Cytotoxicity. *MCB* 23: 6291–6299
- Stojanovic A, Correia MP & Cerwenka A (2018) The NKG2D/NKG2DL Axis in the Crosstalk Between Lymphoid and Myeloid Cells in Health and Disease. *Frontiers in Immunology* 9

- Sumbal J, Budkova Z, Traustadóttir GÁ & Koledova Z (2020) Mammary Organoids and 3D Cell Cultures: Old Dogs with New Tricks. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 25: 273–288
- Sun C, Xu J, Huang Q, Huang M, Wen H, Zhang C, Wang J, Song J, Zheng M, Sun H, *et al* (2016) High NKG2A expression contributes to NK cell exhaustion and predicts a poor prognosis of patients with liver cancer. *Oncoimmunology* 6
- Sun P, Yuan Y, Li A, Li B & Dai X (2010) Cytokeratin expression during mouse embryonic and early postnatal mammary gland development. *Histochem Cell Biol* 133: 213–221
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A & Bray F (2021) Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 71: 209–249
- Suraneni MV & Badeaux MD (2013) Tumor-Initiating Cells, Cancer Metastasis and Therapeutic Implications Landes Bioscience
- Sutlu T & Alici E (2009) Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *Journal of Internal Medicine* 266: 154–181
- Swain SM, Baselga J, Kim S-B, Ro J, Semiglazov V, Campone M, Ciruelos E, Ferrero J-M, Schneeweiss A, Heeson S, *et al* (2015) Pertuzumab, Trastuzumab, and Docetaxel in HER2-Positive Metastatic Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 372: 724–734
- Swain SM, Miles D, Kim S-B, Im Y-H, Im S-A, Semiglazov V, Ciruelos E, Schneeweiss A, Loi S, Monturus E, *et al* (2020) Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel for HER2-positive metastatic breast cancer (CLEOPATRA): end-of-study results from a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol* 21: 519–530
- Swain SM, Shastry M & Hamilton E (2022) Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions. *Nat Rev Drug Discov*: 1–26
- Swonger JM, Liu JS, Ivey MJ & Tallquist MD (2016) Genetic tools for identifying and manipulating fibroblasts in the mouse. *Differentiation* 92: 66–83
- Taddei I, Deugnier M-A, Faraldo MM, Petit V, Bouvard D, Medina D, Fässler R, Thiery JP & Glukhova MA (2008)  $\beta$ 1 Integrin deletion from the basal compartment of the mammary epithelium affects stem cells. *Nat Cell Biol* 10: 716–722
- Tam YK, Miyagawa B, Ho VC & Klingemann H-G (1999) Immunotherapy of Malignant Melanoma in a SCID Mouse Model Using the Highly Cytotoxic Natural Killer Cell Line NK-92. <https://home.liebertpub.com/scd>
- Tarantino P, Morganti S, Uliano J, Giugliano F, Crimini E & Curigliano G (2021) Margetuximab for the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy* 21: 127–133
- Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ & Nieto MA (2009) Epithelial-Mesenchymal Transitions in Development and Disease. *Cell* 139: 871–890
- Thomas L (1982) On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55: 329–333
- Thurin M (2021) Tumor-Associated Glycans as Targets for Immunotherapy: The Wistar Institute Experience/Legacy. *Monoclonal Antibodies in Immunodiagnosis and Immunotherapy* 40: 89–100
- Tian X & Zhou B (2021) Strategies for site-specific recombination with high efficiency and precise spatiotemporal resolution. *Journal of Biological Chemistry* 296: 100509
- Till BG, Jensen MC, Wang J, Chen EY, Wood BL, Greisman HA, Qian X, James SE, Raubitschek A, Forman SJ, *et al* (2008) Adoptive immunotherapy for indolent non-Hodgkin lymphoma and mantle cell lymphoma using genetically modified autologous CD20-specific T cells. *Blood* 112: 2261–2271
- Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D & Seifried E (2001) Cellular Immunotherapy of Malignancies Using the Clonal Natural Killer Cell Line NK-92. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 10: 535–544
- Tonn T, Schwabe D, Klingemann HG, Becker S, Esser R, Koehl U, Suttorp M, Seifried E, Ottmann OG & Bug G (2013) Treatment of patients with advanced cancer with the natural killer cell line NK-92. *Cytotherapy* 15: 1563–1570

- Trembath AP & Markiewicz MA (2018) More than Decoration: Roles for Natural Killer Group 2 Member D Ligand Expression by Immune Cells. *Frontiers in Immunology* 9
- Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, Myśliwska J & Hellmann A (2009) First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clinical Immunology* 133: 22–26
- Tsuchiya H & Shiota G (2021) Immune evasion by cancer stem cells. *Regen Ther* 17: 20–33
- Uherek C, Tonn T, Uherek B, Becker S, Schnierle B, Klingemann H-G & Wels W (2002) Retargeting of natural killer-cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood* 100: 1265–1273
- Usary J, Zhao W, Darr D, Roberts PJ, Liu M, Balletta L, Karginova O, Jordan J, Combest A, Bridges A, *et al* (2013) Predicting drug responsiveness in human cancers using genetically engineered mice. *Clin Cancer Res* 19: 4889–4899
- Valiante NM, Uhrberg M, Shilling HG, Lienert-Weidenbach K, Arnett KL, D'Andrea A, Phillips JH, Lanier LL & Parham P (1997) Functionally and Structurally Distinct NK Cell Receptor Repertoires in the Peripheral Blood of Two Human Donors. *Immunity* 7: 739–751
- Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, Kong N, Kammlott U, Lukacs C, Klein C, *et al* (2004) In Vivo Activation of the p53 Pathway by Small-Molecule Antagonists of MDM2. *Science* 303: 844–848
- Veluchamy JP, Kok N, van der Vliet HJ, Verheul HMW, de Gruijl TD & Spanholtz J (2017) The Rise of Allogeneic Natural Killer Cells As a Platform for Cancer Immunotherapy: Recent Innovations and Future Developments. *Front Immunol* 8
- Verneris MR & Miller JS (2009) The Phenotypic and Functional Characteristics of Umbilical Cord Blood and Peripheral Blood Natural Killer Cells. *Br J Haematol* 147: 185–191
- Vinay DS, Ryan EP, Pawelec G, Talib WH, Stagg J, Elkord E, Lichtor T, Decker WK, Whelan RL, Kumara HMCS, *et al* (2015) Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. *Seminars in Cancer Biology* 35: S185–S198
- Vinci M, Gowan S, Boxall F, Patterson L, Zimmermann M, Court W, Lomas C, Mendiola M, Hardisson D & Eccles SA (2012) Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* 10: 29
- Visvader JE (2009) Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 23: 2563–2577
- Visvader JE & Stingl J (2014) Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev* 28: 1143–1158
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T & Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9: 503–510
- Vogelstein B & Kinzler KW (1993) The multistep nature of cancer. *Trends in Genetics* 9: 138–141
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA & Kinzler KW (2013) Cancer Genome Landscapes. *Science* 339: 1546–1558
- Wachter F, Grunert M, Blaj C, Weinstock DM, Jeremias I & Ehrhardt H (2013) Impact of the p53 status of tumor cells on extrinsic and intrinsic apoptosis signaling. *Cell Communication and Signaling* 11: 27
- Wahdan-Alaswad R, Liu B & Thor AD (2020) Targeted lapatinib anti-HER2/ErbB2 therapy resistance in breast cancer: opportunities to overcome a difficult problem. *Cancer Drug Resistance* 3: 179–198
- Waldhauer I & Steinle A (2008) NK cells and cancer immunosurveillance. *Oncogene* 27: 5932–5943
- Wallin RPA, Screpanti V, Michaëlsson J, Grandien A & Ljunggren H-G (2003) Regulation of perforin-independent NK cell-mediated cytotoxicity. *European Journal of Immunology* 33: 2727–2735
- Walzer T, Dalod M, Robbins SH, Zitvogel L & Vivier E (2005) Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". *Blood* 106: 2252–2258

- Wang B, Wang Q, Wang Z, Jiang J, Yu S-C, Ping Y-F, Yang J, Xu S-L, Ye X-Z, Xu C, *et al* (2014) Metastatic Consequences of Immune Escape from NK Cell Cytotoxicity by Human Breast Cancer Stem Cells. *Cancer Research* 74: 5746–5757
- Wang H, Kavanaugh MP, North RA & Kabat D (1991) Cell-surface receptor for ecotropic murine retroviruses is a basic amino-acid transporter. *Nature* 352: 729–731
- Wang S, Jiang J, Liang X & Tang Y (2015) Links between cancer stem cells and epithelial–mesenchymal transition. *Onco Targets Ther* 8: 2973–2980
- Wang X, Lin G, Martins-Taylor K, Zeng H & Xu R-H (2009) Inhibition of Caspase-mediated Anoikis Is Critical for Basic Fibroblast Growth Factor-sustained Culture of Human Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem* 284: 34054–34064
- Wang X & Rivière I (2016) Clinical manufacturing of CAR T cells: foundation of a promising therapy. *Molecular Therapy - Oncolytics* 3: 16015
- Wang Y-H & Scadden DT (2015) Harnessing the apoptotic programs in cancer stem-like cells. *EMBO Rep* 16: 1084–1098
- Watzl C (2014) How to Trigger a Killer. In *Advances in Immunology* pp 137–170. Elsevier
- Weigelt B, Geyer FC & Reis-Filho JS (2010) Histological types of breast cancer: How special are they? *Mol Oncol* 4: 192–208
- Weinberg RA (1994) Oncogenes and tumor suppressor genes. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 44: 160–170
- Weinkove R, George P, Dasyam N & McLellan AD (2019) Selecting costimulatory domains for chimeric antigen receptors: functional and clinical considerations. *Clinical & Translational Immunology* 8: e1049
- Weinstein IB & Joe AK (2006) Mechanisms of disease: Oncogene addiction--a rationale for molecular targeting in cancer therapy. *Nat Clin Pract Oncol* 3: 448–457
- Wels W, Harwerth I-M, Mueller M, Groner B & Hynes NE (1992) Selective Inhibition of Tumor Cell Growth by a Recombinant Single-Chain Antibody-Toxin Specific for the erbB-2 Receptor. *CANCER RESEARCH*: 6310–6317
- Wensveen FM, Jelenčić V & Polić B (2018) NKG2D: A Master Regulator of Immune Cell Responsiveness. *Frontiers in Immunology* 9
- Wieduwilt MJ & Moasser MM (2008) The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65: 1566
- Wilkinson MG & Millar JBA (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB j* 14: 2147–2157
- Williams BA, Law AD, Routy B, denHollander N, Gupta V, Wang X-H, Chaboureau A, Viswanathan S & Keating A (2017) A phase I trial of NK-92 cells for refractory hematological malignancies relapsing after autologous hematopoietic cell transplantation shows safety and evidence of efficacy. *Oncotarget* 8: 89256–89268
- Wlodkovic D, Telford W, Skommer J & Darzynkiewicz Z (2011) Apoptosis and Beyond: Cytometry in Studies of Programmed Cell Death. *Methods Cell Biol* 103: 55–98
- World Health Organization General information (Deads/Year). <https://www.who.int/westernpacific/health-topics/cancer> (accessed 12.7.22).
- Worthylake R, Opresko LK & Wiley HS (1999) ErbB-2 Amplification Inhibits Down-regulation and Induces Constitutive Activation of Both ErbB-2 and Epidermal Growth Factor Receptors \*. *Journal of Biological Chemistry* 274: 8865–8874
- Wu H-T, Zhong H-T, Li G-W, Shen J-X, Ye Q-Q, Zhang M-L & Liu J (2020) Oncogenic functions of the EMT-related transcription factor ZEB1 in breast cancer. *J Transl Med* 18: 51
- Wu Y, Tian Z & Wei H (2017) Developmental and Functional Control of Natural Killer Cells by Cytokines. *Front Immunol* 8
- Xie G, Dong H, Liang Y, Ham JD, Rizwan R & Chen J (2020) CAR-NK cells: A promising cellular immunotherapy for cancer. *EBioMedicine* 59
- Xing Y & Hogquist KA (2012) T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a006957

- Yan H, Yu K, Zhang K, Liu L & Li Y (2017) Efficacy and safety of trastuzumab emtansine (T-DM1) in the treatment of HER2-positive metastatic breast cancer (MBC): a meta-analysis of randomized controlled trial. *Oncotarget* 8: 102458–102467
- Yan Y, Steinherz P, Klingemann HG, Dennig D, Childs BH, McGuirk J & O'Reilly RJ (1998) Antileukemia activity of a natural killer cell line against human leukemias. *Clin Cancer Res* 4: 2859–2868
- Yang H, Sun L, Liu M & Mao Y (2018) Patient-derived organoids: a promising model for personalized cancer treatment. *Gastroenterol Rep (Oxf)* 6: 243–245
- Yang X, Wang H & Jiao B (2016a) Mammary gland stem cells and their application in breast cancer. *Oncotarget* 8: 10675–10691
- Yang Y, Lim O, Kim TM, Ahn Y-O, Choi H, Chung H, Min B, Her JH, Cho SY, Keam B, *et al* (2016b) Phase I Study of Random Healthy Donor-Derived Allogeneic Natural Killer Cell Therapy in Patients with Malignant Lymphoma or Advanced Solid Tumors. *Cancer Immunol Res* 4: 215–224
- Yaqinuddin A & Kashir J (2020) Innate immunity in COVID-19 patients mediated by NKG2A receptors, and potential treatment using Monalizumab, Cholroquine, and antiviral agents. *Med Hypotheses* 140: 109777
- Yewdell JW, Reits E & Neefjes J (2003) Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 3: 952–961
- Yu D & Hung M-C (2000) Overexpression of ErbB2 in cancer and ErbB2-targeting strategies. *Oncogene* 19: 6115–6121
- Zakrzewski W, Dobrzyński M, Szymonowicz M & Rybak Z (2019) Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy* 10: 68
- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES & Perussia B (1998a) Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med* 188: 2375–2380
- Zamai L, Ahmad M, Bennett IM, Azzoni L, Alnemri ES & Perussia B (1998b) Natural Killer (NK) Cell-mediated Cytotoxicity: Differential Use of TRAIL and Fas Ligand by Immature and Mature Primary Human NK Cells. *J Exp Med* 188: 2375–2380
- Zazo S, González-Alonso P, Martín-Aparicio E, Chamizo C, Cristóbal I, Arpí O, Rovira A, Albanell J, Eroles P, Lluch A, *et al* (2016) Generation, characterization, and maintenance of trastuzumab-resistant HER2+ breast cancer cell lines. *Am J Cancer Res* 6: 2661–2678
- Zhang C, Burger MC, Jennewein L, Genßler S, Schönfeld K, Zeiner P, Hattingen E, Harter PN, Mittelbronn M, Tonn T, *et al* (2016a) ErbB2/HER2-Specific NK Cells for Targeted Therapy of Glioblastoma. *J Natl Cancer Inst* 108
- Zhang C, Oberoi P, Oelsner S, Waldmann A, Lindner A, Tonn T & Wels WS (2017) Chimeric Antigen Receptor-Engineered NK-92 Cells: An Off-the-Shelf Cellular Therapeutic for Targeted Elimination of Cancer Cells and Induction of Protective Antitumor Immunity. *Front Immunol* 8: 533
- Zhang C, Wang X, Li S, Twelkmeyer T, Wang W, Zhang S, Wang S, Chen J, Jin X, Wu Y, *et al* (2019a) NKG2A is a NK cell exhaustion checkpoint for HCV persistence. *Nature Communications* 10
- Zhang F, Frost AR, Blundell MP, Bales O, Antoniou MN & Thrasher AJ (2010) A Ubiquitous Chromatin Opening Element (UCOE) Confers Resistance to DNA Methylation-mediated Silencing of Lentiviral Vectors. *Molecular Therapy* 18: 1640–1649
- Zhang J, Tian X-J & Xing J (2016b) Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- $\beta$ , SHH, and WNT and Their Crosstalks. *J Clin Med* 5: 41
- Zhang J, Zheng H & Diao Y (2019b) Natural Killer Cells and Current Applications of Chimeric Antigen Receptor-Modified NK-92 Cells in Tumor Immunotherapy. *Int J Mol Sci* 20
- Zhang L, Meng Y, Feng X & Han Z (2022) CAR-NK cells for cancer immunotherapy: from bench to bedside. *Biomark Res* 10: 12
- Zhang P, Sun Y & Ma L (2015) ZEB1: At the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* 14: 481–487
- Zhang Z, Liu S, Zhang B, Qiao L, Zhang Y & Zhang Y (2020) T Cell Dysfunction and Exhaustion in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8

- Zhao Y, Chen N, Yu Y, Zhou L, Niu C, Liu Y, Tian H, Lv Z, Han F & Cui J (2017) Prognostic value of MICA/B in cancers: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8: 96384–96395
- Zhao Z, Chen X, Dowbaj AM, Sljukic A, Bratlie K, Lin L, Fong ELS, Balachander GM, Chen Z, Soragni A, *et al* (2022) Organoids. *Nat Rev Methods Primers* 2: 1–21
- Zhou H-M, Zhang J-G, Zhang X & Li Q (2021) Targeting cancer stem cells for reversing therapy resistance: mechanism, signaling, and prospective agents. *Sig Transduct Target Ther* 6: 1–17
- Zhou Q, Uhlig KM, Muth A, Kimpel J, Lévy C, Münch RC, Seifried J, Pfeiffer A, Trkola A, Coulibaly C, *et al* (2015) Exclusive Transduction of Human CD4+ T Cells upon Systemic Delivery of CD4-Targeted Lentiviral Vectors. *The Journal of Immunology* 195: 2493–2501
- Zingoni A, Cerboni C, Ardolino M & Santoni A (2010) Modulation of T Cell-Mediated Immune Responses by Natural Killer Cells. In *Natural Killer Cells*, Zimmer J (ed) pp 315–327. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg
- Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L & Trono D (1998) Self-Inactivating Lentivirus Vector for Safe and Efficient In Vivo Gene Delivery. *J Virol* 72: 9873–9880



## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Immunoediting.....	5
Abb. 1.2 Mechanismen der NK-Zell-vermittelten Zytotoxizität.....	10
Abb. 1.3 Chimäre Antigenrezeptoren (CARs).....	15
Abb. 1.4 ErbB-Rezeptor-Tyrosinkinasen und ErbB2-zielgerichtete Therapieansätze.....	25
Abb. 3.1: Anatomie und Aufbereitung des murinen Brustfettgewebes.....	55
Abb. 3.2: Antikörpertitration.....	62
Abb. 3.3: Repräsentative Gating-Strategie der Zellzyklusanalyse.....	65
Abb. 3.4: Repräsentative Gating-Strategie eines Durchflusszytometer-basierten Degranulationsassays.....	67
Abb. 3.5: Repräsentative Gating-Strategie eines Durchflusszytometer-basierten Zytotoxizitätsassays.....	68
Abb. 4.1 Anatomie und zelluläre Zusammensetzung des murinen Brustfettpolsters.....	82
Abb. 4.2 Primärkultur dissoziierter Brustfettpolster.....	85
Abb. 4.3 Anreicherung muriner Brustepithelzellen in 3D-Kultur.....	86
Abb. 4.4 Aufbau von Organoiden muriner Brustepithelzellen.....	88
Abb. 4.5 Zelluläre Heterogenität muriner Brustepithelzellen in 3D-Kultur.....	89
Abb. 4.6 Generierung muriner Mamma-Organoiden mit neoplastischen Treibermutationen.....	92
Abb. 4.7 Etablierung der lentiviralen Transduktion mit MLV-pseudotypisierten Vektorpartikeln.....	93
Abb. 4.8 Generierung und funktionale Analyse von Reporterzellen zur Aktivitätstestung der Cre-Rekombinase.....	95
Abb. 4.9 ErbB2-Expression nach genetischer Modifikation von Mamma-Organoiden des CKP-Mausmodells.....	96
Abb. 4.10 Deletion von p53 nach genetischer Modifikation von Mamma-Organoiden des CKP-Mausmodells.....	98
Abb. 4.11 Kras <sup>G12V</sup> -Expression in modifizierten Mamma-Organoiden des CKP-Modells.....	100
Abb. 4.12 Morphologische Veränderungen genetisch modifizierter Mamma-Organoiden des CKP-Mausmodells.....	102
Abb. 4.13 Ki67-Expression und Zellzyklusanalyse von Mamma-Organoiden des CKP-Modells.....	104
Abb. 4.14 Detektion von $\gamma$ H2AX als Nachweis für DNA-Doppelstrangbrüche in von Mamma-Organoiden des CKP-Modells abgeleiteten 2D-Kulturen.....	106
Abb. 4.15 Generierung von Reporter-exprimierenden Mamma-Organoiden.....	108
Abb. 4.16 Natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität von NK-92 Zellen gegen dissoziierte Mamma-Organoiden.....	110
Abb. 4.17 Degranulation von parentalen und CAR-exprimierenden NK-92 Zellen in Ko-Kulturen mit dissoziierten Mamma-Organoiden.....	112
Abb. 4.18 Etablierung eines Luciferase-Reporterassays zur Zytotoxizitätsbestimmung.....	114
Abb. 4.19 Biolumineszenz-basierte Zytotoxizitätsassays mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und 2D- oder 3D-Kulturen.....	115
Abb. 4.20 Langzeit-Ko-Kulturen zur Analyse der von parentalen und CAR-exprimierenden NK-92 Zellen vermittelten Zytotoxizität gegen Mamma-Organoiden.....	116
Abb. 4.21 Expression der Todesrezeptor-Liganden TRAIL und FasL auf NK-92 Zellen nach Stimulation mit Zielzellen.....	117
Abb. 4.22 Generierung und Charakterisierung von p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> -Mamma-Organoiden.....	120
Abb. 4.23 Biolumineszenz-basiertes Zytotoxizitätsassay mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und Mamma-Organoiden.....	122
Abb. 4.24 Mikroskopie-basiertes Zytotoxizitätsassay mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und luc2-sfGFP-exprimierenden Mamma-Organoiden.....	123
Abb. 4.25 NK-Zell-vermittelte Lyse in Abhängigkeit von der Organoid-Größe.....	126
Abb. 4.26 Tumor-Plastizität nach seriellem <i>in vivo</i> Passagieren.....	129
Abb. 4.27 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) <i>in vivo</i> passagierter Organoiden.....	131
Abb. 4.28 Epithelial-Mesenchymale Transition (EMT) und Krebsstammzellen.....	133
Abb. 4.29 <i>Engraftment in vivo</i> passagierter ErbB2/p53 <sup>-/-</sup> /Kras <sup>G12V</sup> -Organoiden in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen.....	135



Abb. 4.30 Natürliche und CAR-vermittelte Zytotoxizität von NK-Zellen gegen dissoziierte *in vivo* passagierte Mamma-Organoiden mit heterogenem Phänotyp ..... 136

Abb. 4.31 Mikroskopie-basiertes Zytotoxizitätsassay mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und heterogenen Tumor-Organoiden. .... 137

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Laborgeräte .....	30
Tab. 2.2 Chemikalien und Reagenzien.....	31
Tab. 2.3 Puffer und Lösungen .....	33
Tab. 2.4 Verbrauchsmaterial.....	33
Tab. 2.5 Molekulargewichtsstandards und Ladepuffer .....	34
Tab. 2.6 Enzyme.....	34
Tab. 2.7 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper .....	35
Tab. 2.8 Kits.....	37
Tab. 2.9 Plasmide.....	38
Tab. 2.10 Oligonukleotide .....	39
Tab. 2.11 Bakterienmedien und Antibiotika .....	39
Tab. 2.12 Bakterienstämme .....	40
Tab. 2.13 Zellkulturmedien, Zusätze und rekombinante Proteine .....	40
Tab. 2.14 Eukaryotische Zelllinien und Kulturbedingungen .....	41
Tab. 2.15 Mauslinien .....	44
Tab. 2.16 Software .....	44
Tab. 3.1 Pipettierschema einer PCR unter Verwendung der Q5- oder einer <i>Taq</i> -Polymerase .....	46
Tab. 3.2 Thermocycler-Protokoll einer PCR unter Verwendung der Q5- oder einer <i>Taq</i> -Polymerase .....	46
Tab. 3.3 Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel .....	52
Tab. 3.4 Pipettierschema für die Ko-Transfektion von HEK293T zur Herstellung von Vektorpartikeln.....	59
Tab. 3.5 PCR zur Genotypisierung von SKP-Mäusen.....	78
Tab. 4.1: Statistische Analyse des Zeitraffer-Experiments mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und luc2-sfGFP-exprimierenden Mamma-Organoiden.....	124
Tab. 4.2: Linearer Zusammenhang zwischen NK-Zell-vermittelter Lyse und Organoid-Größe .....	127
Tab. 4.3: Statistische Analyse des Zeitraffer-Experiments mit parentalen oder CAR-exprimierenden NK-92 Zellen und luc2-sfGFP-exprimierenden heterogenen Tumor-Organoiden: .....	138

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	FCS	<i>Forward Scatter</i>
µg	Mikrogramm	FDA	Food and Drug Administration
µl	Mikroliter	FDG	Fluorescein di-β-D-galactopyranoside
µm	Mikrometer	FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i>
µM	Mikromolar	G	Erdbeschleunigung
2D/3D	zweidimensional/dreidimensional	GALV	<i>Gibbon Ape Leukemia Virus</i>
Abb.	Abbildung	GFP	Green fluorescent protein
ACT	<i>Adoptive Cell Therapy</i>	GMP	Good manufacturing practice
ADCC	<i>Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity</i>	GvHD	<i>Graft-versus-Host Disease</i>
AF	Alexa Fluor	GvL	<i>Graft-versus-Leukemia</i>
alloSCT	allogene Stammzelltransplantation	Gzm	Granzyme
AML	Akute myeloische Leukämie	h	Stunde
APC	Allophycocyanin (Fluorochrom)	HCMV	humanen Zytomegalievirus
APCs	<i>Antigen-presenting cells</i>	HER2	<i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
APS	Ammoniumpersulfat	HGF	<i>Hepatocyte Growth factor</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>	HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
BME	β-Mercaptoethanol	HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
Bp	Basenpaar	HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
BRAC1/2	<i>breast cancer susceptibility 1/ 2</i>	HSCs	<i>Hematopoietic stem cells</i>
BSA	Bovines Serumalbumin	ICANS	<i>Immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome</i>
BV	Brilliant™ Violet	ICOS	<i>Inducible costimulator domain</i>
ca.	circa	IFN-γ	Interferon-γ
CAFs	<i>Cancer-associated fibroblasts</i>	Ig	Immunglobulin
CAR	chimären Antigenrezeptoren	IL	Interleukin
CD	cluster of differentiation	ILT-2	<i>Ig-like transcript 2</i>
CDK	Cyclin-abhängigen Kinasen	iPSCs	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>	IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
CKP	CC10-CreERT2Kras <sup>LSL.G12Vgeo/WT</sup> Trp53 <sup>fl/fl</sup>	IS	Immunologische Synapse
cm	Zentimeter	ITAM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
CMV	Cytomegalievirus	ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif</i>
Cre	Cre-Rekombinase	IU	<i>International unit</i>
CRS	<i>Cytokine release syndrome</i>	K	Zytokeratin
CSC	<i>Cancer stem cell</i>	kb	Kilobase
CV	Calcein Violet AM	kDa	Kilo-Dalton
DAMP	<i>Damage-associated molecular patterns</i>	KIR	Killerzell-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
DAP-10/12	<i>DNAX-activation protein-10/12</i>	KLR	Killerzell-Lektin-ähnliche-Rezeptoren
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol	KRas	<i>Kirsten rat sarcoma virus</i>
DCs	<i>Dendritic cells</i>	KV	Kristallviolett
ddH2O	Doppelt destilliertes Wasser	LAK	Lymphokin-aktivierte Killerzellen
DISC	<i>Death-inducing signaling complex</i>	LB	Luria Burtani
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	LFA-1	<i>Lymphocyte Function-associated Antigen 1</i>
DMF	Dimethylformamid	Lin	<i>Lineage</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	LIR	Leukozyten-Immunglobulin-ähnliche Rezeptoren
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LTR	<i>Long terminal repeats</i>
dNTP	Desoxynukleotid-5'-triphosphat	Luc	Luciferase
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline	LUT	<i>Lookup table</i>
DSB	Doppelstrangbrüche	mA	Milliampère
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
E/T	Effektor/Target	MaSCs	<i>Mammary stem cells</i>
ECL	Enhanced chemiluminescence	MDSCs	<i>Myeloid-derived suppressor cell</i>
ECM	<i>Extracellular matrix</i>	MEC	<i>Mammary epithelial cells</i>
EDTA	Ethylendiamintet	MFI	Mean fluorescence intensity
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>	mg	Milligramm
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	MHC	Major histocompatibility complex
EMA	European Medicines Agency	MICA/B	MHC class I chain-related protein A/B
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition	min	Minute
EpCAM	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>	MIP	Maximumintensitätsprojektionen
ER	Estrogen (Östrogen)	ml	Milliliter
Erk1/2	<i>Extracellular signal-related kinases 1 and 2</i>	MLV	Murines Leukämievirus
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	mM	Millimolar
FasL	Fas-Ligand	TF	Transkriptionsfaktoren
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>	TGF-β	<i>Transforming growth factor beta</i>
FcRγ	Fc-Rezeptor γ	TIL	Tumorinfiltrierende Lymphozyten
MMTV-LTR	<i>Mammary tumor virus-long terminal repeat</i>		
ms	Millisekunde		
MTOC	<i>Microtubule organizing center</i>		

NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>	TLS	Tumorlyse-Syndrom
NCT	National Clinical Trial	TME	<i>Tumor microenvironment</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
ng	Nanogramm	T <sub>reg</sub>	Regulatorischer T-Zellen
NHL	<i>Non-Hodgkin-Lymphoms</i>	TRUCK	<i>T cell redirected for universal cytokine-mediated killing</i>
NK-Zelle	natürliche Killerzellen	TSA	Tumorspezifische Antigene
nm	Nanometer	TU	<i>Transducing Units</i>
nM	Nanomolar	U	Enzyme Unit
ns	Nicht signifikant	UV	Ultraviolet
ORF	<i>Open reading frame</i>	V	Volt
OS	<i>Overall survival</i>	v/v	<i>volume/volume percent</i>
PAA	Polyacrylamid	V <sub>H</sub> /V <sub>L</sub>	variable heavy chain/variable light chain
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase	VSV	Vesikulärem Stomatitis-Virus
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>	w/v	<i>weight/volume percent</i>
PCC	<i>Pearson's Correlation Coefficient</i>	ZAP-70	<i>Zeta-chain associated protein 70</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	ZEB1	<i>Zinc finger E-box binding homeobox 1</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death-ligand 1</i>	α	Anti-
PDO	<i>Patient derived organoids</i>		
PDX	<i>Patient-derived xenograft</i>		
PE	Phycocerythrin		
PEI	Polyethylenimin		
PFA	Paraformaldehyd		
PFS	<i>Progression-free survival</i>		
PgR	Progesteronrezeptor		
PI	Propidiumiodid		
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase		
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5- Trisphosphat		
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat		
PMTs	<i>Photomultiplier tubes</i>		
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RIPA	radioimmunoprecipitation assay		
rpm	rounds per minute		
RPMI	Roswell Park Memorial Institute		
RT	Raumtemperatur		
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinasen		
s	Sekunde		
scFv	<i>single chain fragment variable</i>		
SCID	<i>Severe combined immunodeficiency</i>		
SD	<i>Standard deviation</i>		
SDS	Sodium dodecyl sulphate		
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophores		
SEM	<i>Standard error of the mean</i>		
SFFV	<i>Spleen focus-forming virus</i>		
sfGFP	Superfolder-GFP		
SHIP	<i>SH2-containing inositol polyphosphate 5-phosphatase</i>		
SHP-1/2	<i>SH2 domain-containing phosphatase-1/ -2</i>		
SNARE	<i>Soluble-N-ethylmaleimide-sensitive-factor accessory-protein receptor</i>		
SSC	<i>Sideward Scatter</i>		
SUPRA-CAR	<i>Split, Universal, and Programmable-CAR</i>		
SV	Simian-Virus		
Syk	<i>Spleen tyrosin kinase</i>		
TAA	tumorassoziierte Antigene		
Tab.	Tabelle		
TAE	Tris-Acetat-EDTA		
TCR	<i>T cell receptor</i>		
TDLE	Terminalen duktulo-lobulären Einheiten		
TEBS	<i>Terminal end buds,</i>		
TEMED	Tetramethylethylendiamin		

## Publikationen

### Veröffentlichungen

- Pfeifer Serrahima, J., Zhang, C., Oberoi, P., Bodden, M., Röder, J., Arndt, C., Feldmann, A., Kiefer, A., Prüfer, M., Kühnel, I., Tonn, T., Bachmann, M. & Wels, W.S. (2023) Multivalent adaptor proteins specifically target NK cells carrying a universal chimeric antigen receptor to ErbB2 (HER2)-expressing cancers. *Cancer Immunology, Immunotherapy*.  
<https://doi.org/10.1007/s00262-023-03374-x>
- Strecker, M.I., Wlotzka, K., Strassheimer, F., Roller, B., Ludmirski, G., König, S., Röder, J., Opitz, C., Alekseeva, T., Reul, J., Sevenich, L., Tonn, T., Wels, W.S., Steinbach, J.P., Buchholz, C.J. & Burger, M.C. (2022) AAV-mediated gene transfer of a checkpoint inhibitor in combination with HER2-targeted CAR-NK cells as experimental therapy for glioblastoma. *Oncoimmunology* 11, 2127508. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2022.2127508>
- Zhang, C., Röder, J., Scherer, A., Bodden, M., Pfeifer Serrahima, J., Bhatti, A., Waldmann, A., Müller, N., Oberoi, P. & Wels, W.S. (2021) Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity. *Journal for Immunotherapy of Cancer* 9, e002980. <https://doi.org/10.1136/jitc-2021-002980>
- Schnalzger, T.E., de Groot, M.H., Zhang, C., Mosa, M.H., Michels, B.E., Röder, J., Darvishi, T., Wels, W.S. & Farin, H.F. (2019) 3D model for CAR-mediated cytotoxicity using patient-derived colorectal cancer organoids. *The EMBO Journal* 38, e100928.  
<https://doi.org/10.15252/emj.2018100928>
- Oelsner, S., Waldmann, A., Billmeier, A., Röder, J., Lindner, A., Ullrich, E., Marschalek, R., Dotti, G., Jung, G., Große-Hovest, L., Oberoi, P., Bader, P. & Wels, W.S. (2019) Genetically engineered CAR NK cells display selective cytotoxicity against FLT3-positive B-ALL and inhibit *in vivo* leukemia growth. *International Journal of Cancer*, ijc.32269. <https://doi.org/10.1002/ijc.32269>
- Rosigkeit, S., Meng, M., Grunwitz, C., Gomes, P., Kreft, A., Hayduk, N., Heck, R., Pickert, G., Ziegler, K., Abassi, Y., Röder, J., Kaps, L., Vascotto, F., Beissert, T., Witzel, S., Kuhn, A., Diken, M., Schuppan, D., Sahin, U., Haas, H. & Bockamp, E. (2018) Monitoring Translation Activity of mRNA-Loaded Nanoparticles in Mice. *Molecular Pharmaceutics* 15, 3909–3919.  
<https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00370>

### Abstracts

- Rodriguez-Candela Mateos, M., Röder, J., Oberoi, P., Wels, W., Santiago-Freijanes, P., Mosquera, J., Acea-Nebriil, B. & Mayan, M.D. (2022) 40P Connexin43 as double therapeutic target in triple-negative breast cancer: Role in tumour progression and antitumour immune response. *Annals of Oncology* 33, S140. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2022.03.055>

### Ausgewählte Posterpräsentationen

- Anne Scherer, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Malena Bodden, Aline Häcker, Ines Kühnel, Winfried S. Wels (2022)  
 “Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity”  
 UCT Science Day, Frankfurt

Bastian Roller, Lisa Marie Reindl, Florian Strassheimer, Anne Scherer, Jasmin Röder, Joachim P Steinbach, Winfried S Wels, Evelyn Ullrich, Michael C Burger (2022)

“CAR-engineered primary NK cells show promising effects as a targeted therapy against EGFR-positive glioblastoma cells”

UCT Science Day, Frankfurt

Anne Scherer, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Jordi Pfeifer Serrahima, Jasmin Röder, Malena Bodden, Aline Häcker, Ines Kühnel, Winfried S. Wels (2022)

“Bispecific antibody-mediated redirection of NKG2D-CAR natural killer cells facilitates dual targeting and enhances antitumor activity”

19th Meeting of the Society for Natural Immunity, Bonita Springs, USA

Jordi Pfeifer Serrahima, Congcong Zhang, Pranav Oberoi, Malena Bodden, Jasmin Röder, Claudia Arndt, Torsten Tonn, Michael Bachmann, Winfried Wels (2021)

“Multivalent adapter proteins for specific targeting of off-the-shelf UniCAR NK Cells to ErbB2 (HER2)-expressing cancers”

13th PEGS Europe, Barcelona, ESP

Jasmin Röder, Tijna Alekseeva, Mark Schmitt, Sebastian Rosigkeit, Lisa Sevenich, Ernesto Bockamp, Florian R. Greten, Winfried S. Wels (2019)

“Modulation of the tumor microenvironment and control of tumor growth by CAR-NK cells in genetically engineered mouse models of solid tumors and cancer metastasis”

1st Rhein-Main Cancer Retreat, Königstein

## Danksagung

Aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.



# Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht veröffentlicht.