

Aus der Klinik für Urologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. P. Albers

Charakterisierung des Immunphänotyps von Urothelkarzinom-  
Zelllinien sowie Tumor-Zelllinien von Kopf und Hals  
nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von  
Carolin König  
2024

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: PD Dr. Michèle Hoffmann

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Kathrin Scheckenbach

Für meine Eltern

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Grunewald, C.M. et al, (2021), Epigenetic Priming of Bladder Cancer Cells With Decitabine Increases Cytotoxicity of Human EGFR and CD44v6 CAR Engineered T-Cells. *Front Immunol*, (12) 782448 [1]

## Zusammenfassung

Sowohl Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals als auch das Urothelkarzinom sind häufige Tumorarten, für die multimodale Therapiekonzepte mit Chemotherapie, chirurgischer Resektion, Bestrahlung und moderne Immuntherapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren bestehen. Letztere sollen eine Inaktivierung von cytotoxischen T-Zellen vermeiden, die durch Tumorzellen über Liganden-Rezeptor-Interaktion induziert werden kann. Dennoch kommt es häufig zu Rezidiven und Therapieversagen gegenüber Cisplatin-basierter Chemotherapie oder Immuntherapie. Während die vielfältigen Chemoresistenzmechanismen jahrzehntelang erforscht wurden, sind die Gründe für das Versagen von Immuntherapien und wie das Therapieansprechen verbessert werden kann bislang weniger verstanden. Offenbar entgehen die Tumorzellen häufig einer Erkennung und Eliminierung durch die zelluläre Immunantwort. Viele der zugrundeliegenden Prozesse sind epigenetisch reguliert. Daher war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen ob durch eine Vorbehandlung mit epigenetischen Inhibitoren der Immunphänotyp von Tumorzelllinien von Kopf und Hals sowie Urothelkarzinomzelllinien verändert werden kann, sodass eine bessere Erkennung von Tumorzellen durch das Immunsystem erreicht werden kann. Dazu wurden die Tumorzelllinien jeweils mit Romidepsin (Histondeacetylase-Inhibitor) oder Decitabine (DNA-Methyltransferase-Inhibitor) behandelt. Anschließend wurden in den Tumorzelllinien Interaktionsmoleküle für T-Zellen (PD-L1/2, ICAM-1 und CD95/Fas-R) und NK-Zellen (ULBP-3) vermessen. Zudem wurde der Behandlungseffekt auf Chemokine (CCL2, CCL5, CXCL10 und CXCL11) und den cGAS-STING Signaltransduktionsweg der „viral Mimicry“ (STAT1, IFI44, OASL) bestimmt. CAR-T-Zellen dienten als Modellsystem, um Effekte auf die Interaktion zwischen Tumorzellen und T-Zellen nach epigenetischer Behandlung der Tumorzellen zu untersuchen.

Vor allem die Behandlung mit Decitabine zeigte eher eine kostimulatorische Auswirkungen auf Marker für die T-Zellinteraktion, während die Behandlung mit Romidepsin Koinhibitoren verstärkte. Sowohl Romidepsin als auch Decitabine induzieren NKG2D-Liganden, woraus eine bessere NK-Zellinteraktion resultieren kann. Zudem induziert die Behandlung mit Decitabine eine vermehrte Interferonantwort, *Viral Defense* und ERV-Signatur. Bezüglich der Chemokinexpression weisen Decitabine und Romidepsin entgegengesetzte Wirkungen auf. Während die Decitabine-Behandlung eher zu vermehrten Genexpression führt, resultiert aus der Romidepsin-Behandlung überwiegend eine verminderte Chemokinexpression. Auch die Aktivierung des *Viral Mimicry* Signalwegs wird vor allem durch Decitabine induziert. In einigen Ergebnissen spiegelt sich zudem die Heterogenität von UC und HNSCC durch Zelllinien-abhängige Expressionsmuster wider. Dennoch beeinflusst die Decitabine-Behandlung den Immunphänotyp von UC-Zelllinien tendentiell günstig, sodass eine bessere Erkennung von Tumorzellen durch Immunzellen wahrscheinlich ist. Zukünftig muss noch weiter untersucht werden, ob die Vorbehandlung mit epigenetischen Inhibitoren zu einer verbesserten Therapieantwort auf Immuncheckpoint-Inhibitoren führt.

## Summary

Both squamous cell carcinoma of the head and neck and urothelial carcinoma are common tumor types for which multimodal therapy concepts with chemotherapy, surgical resection, radiation and modern immunotherapies with immune checkpoint inhibitors exist. The latter are intended to prevent inactivation of cytotoxic T cells, which can be induced by tumor cells via ligand-receptor interaction. Nevertheless, recurrences and treatment failure against Cisplatin-based chemotherapy or immunotherapy are common. While the multiple mechanisms of chemoresistance have been studied for decades, the reasons for immunotherapy failure and how treatment response can be improved are still less understood. Apparently, tumor cells often escape recognition and elimination by the cellular immune response. Many of the underlying processes are epigenetically regulated. Therefore, the aim of this study was to investigate whether the immunophenotype of head and neck tumor cell lines and urothelial carcinoma cell lines can be altered by pretreatment with epigenetic inhibitors so that better recognition of tumor cells by the immune system can be achieved. For this purpose, the tumor cell lines were treated with romidepsin (histone deacetylase inhibitor) or decitabine (DNA methyltransferase inhibitor). Subsequently, interaction molecules for T cells (PD-L1/2, ICAM-1 and CD95/Fas-R) and NK cells (ULBP-3) were measured in the tumor cell lines. In addition, the treatment effect on chemokines (CCL2, CCL5, CXCL10 and CXCL11) and the cGAS-STING signal transduction pathway of viral mimicry (STAT1, IFI44, OASL) was determined. CAR-T cells served as a model system to investigate effects on the interaction between tumor cells and T cells after epigenetic treatment of the tumor cells.

In particular, treatment with decitabine showed more of a costimulatory effect on markers for T cell interaction, while treatment with romidepsin enhanced co-inhibitors. Both romidepsin and decitabine induced NKG2D ligands, which may result in better NK cell interaction. In addition, treatment with decitabine induced an increased interferon response, viral defense and ERV signature. In terms of chemokine expression, decitabine and romidepsin had opposite effects. While decitabine treatment tends to lead to increased gene expression, romidepsin treatment predominantly results in reduced chemokine expression. The activation of the viral mimicry signaling pathway is also primarily induced by decitabine. Some results also reflect the heterogeneity of UC and HNSCC through cell line-dependent expression patterns. Nevertheless, Decitabine treatment tends to favorably influence the immunophenotype of UC cell lines, so that a better recognition of tumor cells by immune cells is likely. In the future, further research is needed to determine whether pretreatment with epigenetic inhibitors leads to an improved therapeutic response to immune checkpoint inhibitors.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BFTC-905	Black Foot disease Transitional Carcinoma 905
BSA	Bovine Serum Albumin
BST2	Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2
CAR	chimeric antigen receptor
CCL2	CC-chemokine ligand 2
CCL5	CC-chemokine ligand 5
CD112 (Nectin 2)	Nectin Cell Adhesion Molecule 2
CD44v6	Isoform des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44
CD95/FAS	Fas Cell Surface Death Receptor
cDNA	Complementary DNA
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTAG2	Cancer Testis Antigen 2
CTSF	Cathepsin F
CTSV	Cathepsin V
CXCL10	C-X-C motif chemokine 10
CXCL11	C-X-C motif chemokine 11
d	Tag
DAPI	4'-6'-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMTi	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsRNA	Doppelstrang Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetracetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERVs	enogene Retroviren
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS/FCS	fetales Rinderserum
GZMM	Granzyme M
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor

HEK293T	<i>Human embryonic kidney 293</i>
HNO	Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i> , Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFI27	Interferon Alpha Inducible Protein 27
IFI30	IFI30 Lysosomal Thiol Reductase
IFI44	Interferon Induced Protein 44
IFI44L	Interferon Induced Protein 44 Like
IFI6	Interferon Alpha Inducible Protein 6
IL-2	Interleukin 2
IMDM	Iscove Modified Dulbecco Media
l	Liter
MAGEA4	MAGE Family Member B4
MAGEB2	MAGE Family Member B2
MEF	Myeloid Elf-1-Like Factor
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
MICA/B	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid
MX1	MX Dynamin Like GTPase 1
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like protein
p	p-Wert (Signifikanzniveau)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-L1 (CD274)	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PD-L2 (CD273)	Programmed Cell Death 1 Ligand 2
PDCD1	Programmed Cell Death 1
PEI	Polytehlenimine
PI	Propidiumiodid
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RAET1G	Retinoic Acid Early Transcript 1G
RNA	Ribonukleinsäure
sek	Sekunde
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1

TAMs	Tumor-assoziierte Makrophagen
UC	Urothelkarzinom
ULBP-3	UL16 Binding Protein 3
UMUC-3	University of Michigan-Urothelial Carcinoma-3
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals .....	1
1.2	Das Harnblasenkarzinom .....	2
1.3	Epigenetik .....	3
1.3.1	Definition .....	3
1.3.2	Epigenetische Inhibitoren .....	3
1.4	Komponenten des Immunphänotyps .....	5
1.4.1	T-Zell-Interaktion .....	6
1.4.2	NK-Zell Interaktion .....	8
1.4.3	Chemokine.....	8
1.4.4	Viral Mimcry .....	9
1.5	Chimäre Antigenrezeptoren in der Tumorthherapie.....	9
1.6	Ziele der Arbeit .....	10
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>12</b>
2.1	Zelllinien.....	12
2.2	Chemikalien, Reagenzien .....	13
2.3	Molekularbiologische Kits.....	14
2.4	Verbrauchsmaterialien.....	14
2.5	Puffer und Lösungen .....	14
2.6	Epigenetische Inhibitoren und Pharmaka.....	14
2.7	Fluoreszenz-Antikörper und zugehörige Lebend-farbstoffe.....	15
2.8	Oligonukleotide .....	16
2.9	Geräte .....	16
2.10	Software .....	17
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>18</b>
3.1	Zellkultur .....	18
3.1.1	Kultivierung der UC- und HNSCC-Zelllinien .....	18
3.1.2	Kultivierung der immortalisierten Urothelzelllinie HBLAK .....	18
3.1.3	Zellzahlbestimmung .....	18
3.1.4	Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren.....	18
3.1.5	Behandlung mit Atezolizumab .....	19
3.2	RNA-Extraktion.....	19
3.3	cDNA-Synthese .....	19
3.4	Quantitative Realtime-PCR.....	19
3.5	MTT-Test.....	20
3.6	Durchflusszytometrie (FACS).....	20
3.7	Zytotoxizitäts-Test nach Kokultivierung von CAR-T-Zellen mit UC-Zelllinien .....	21

3.7.1	Herstellung von CAR-T-Zellen .....	21
3.7.2	Aussaat und Behandlung der UC-Zelllinien .....	22
3.7.3	Ansetzen des Zytotoxizitäts-Tests .....	23
3.7.4	Wash-Out Versuch .....	24
3.7.5	Messung des Zytotoxizitäts-Tests .....	24
<b>3.8</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>24</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>25</b>
4.1	<b>Effekte des HDACi Romidepsin auf die Zellproliferation von HNSCC-Zellen .....</b>	<b>25</b>
4.2	<b>Veränderung des Immunphänotyps nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren.....</b>	<b>26</b>
4.2.1	Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf T-Zell-Interaktionsmoleküle .....	26
4.2.2	Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf NK-Zell-Interaktionsmolekülen .....	38
4.2.3	Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf die Expression von Chemokinen.....	41
4.2.4	Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf die Expression von Surrogatmarkern des Viral Mimicry Signalwegs .....	44
4.3	<b>Zytotoxizitäts-Test nach Koinkubation von T-Zellen mit Tumorzellen .....</b>	<b>48</b>
4.3.1	Abundanz der Epitope EGFR und CD44v6 nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren .....	48
4.3.2	Cytotoxizitäts-Test nach Koinkubation von CAR T –Zellen mit Romidepsin vorbehandelten Tumorzellen .....	55
4.4	<b>RNA-Sequenzierung nach Behandlung mit Decitabine .....</b>	<b>62</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>72</b>
5.1	<b>Wirkung der epigenetischen Inhibitoren auf die T-Zellinteraktion ..</b>	<b>72</b>
5.1.1	Wirkung auf kostimulatorische Faktoren.....	72
5.1.2	Wirkung auf koinhibitorische Faktoren.....	74
5.2	<b>Wirkung der Inhibitoren auf die NK-Zellinteraktion .....</b>	<b>75</b>
5.3	<b>Wirkung der Inhibitoren auf die Chemokinexpression .....</b>	<b>77</b>
5.4	<b>Auswirkungen der Inhibitoren auf den <i>Viral Mimicry</i> Signalweg.....</b>	<b>79</b>
5.5	<b>Ausblick zu Kombinationsbehandlungen mit Immuntherapien ..</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR- UND QUELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>95</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>101</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals

Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals umfassen die Mundhöhle, den Oro-, Hypo- und Nasopharynx sowie den Kehlkopf und sinonasale Schleimhaut. Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals sind Tabak- oder Alkoholkonsum, schlechte Mundhygiene, genetische Risikofaktoren sowie das Humane Papilloma Virus (HPV), welches primär für die Entstehung von oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen verantwortlich ist. Insgesamt zählen Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals zu den sechsthäufigsten Krebsformen weltweit mit einer jährlichen Inzidenz von über 500 000. [2] Bisher gibt es kein effektives Screening zur Früherkennung von Kopf-Hals-Tumoren, daher werden die meisten HNSCC erst im Spätstadium diagnostiziert. [3] Therapiemöglichkeiten sind in der Regel multimodal und umfassen eine Chemotherapie z.B. mit Cisplatin, Paclitaxel, eine Bestrahlung oder die Kombination aus Radio- und Chemotherapie. Hierbei fiel für HPV-positive Tumoren eine bessere Überlebensrate auf. [4] Für die chirurgische Therapie gilt die R0-Resektion, welche eine Tumorfreiheit an den Resektionsrändern impliziert, sowie die Entfernung aller potentiell befallenen Lymphknoten des Halses als Ziel. [5]

Bei Patienten mit lokal fortgeschrittenen Kopf-Hals-Tumoren zeigte sich ein prolongiertes progressionsfreies Überleben für die Kombination einer Hochdosis-Strahlentherapie mit dem monoklonalen Antikörper gegen den *Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR)* Cetuximab im Vergleich zur alleinigen Hochdosis-Strahlentherapie. [6]

Bei Rezidiven und metastasierten Plattenepithelkarzinomen von Kopf und Hals nach platinhaltiger Chemotherapie besteht eine schlechte Prognose und Therapiemöglichkeiten sind stark begrenzt. Neuerdings können monoklonale Antikörper wie Checkpointinhibitoren gegen *PD-1 (anti-programmed death 1)* wie Nivolumab [7] und Pembrolizumab [8] eingesetzt werden.

Rezidive und metastasierte Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals sind aufgrund der bisher unzureichend erforschten molekulargenetischen Hintergründe kaum mehr kurativ zu behandeln. Um neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, ist es also von großer Bedeutung zunächst auf molekulargenetischer Ebene weiter zu forschen. Hierbei stellt die Heterogenität metastasierter Karzinome eine besondere Herausforderung dar, die sich molekular vom Primärtumor von HNSCC deutlich unterscheiden. Dies könnte ursächlich dafür sein, dass nicht jeder molekulare Subtyp von Rezidiven und metastasierten Tumoren auf eine Therapie mit Immuncheckpointinhibitoren anspricht. [9]

## 1.2 Das Harnblasenkarzinom

Etwa 90% der Harnblasenkarzinome sind Urothelkarzinome, Plattenepithel- und Adenokarzinome machen eher einen geringen Anteil aus. Eine wesentliche Ursache für die Entstehung des Harnblasenkarzinoms stellt (wie beim Plattenepithelkarzinom von Kopf und Hals) der Tabakkonsum dar. Weitere Umweltfaktoren wie aromatische Amine, Cyclophosphamid und Phenacetin spielen ebenfalls eine Rolle. Klinisch äußert sich das Harnblasenkarzinom meist durch eine Hämaturie. [10]

Insgesamt stellt das Harnblasenkarzinom die neunthäufigste Krebsursache dar, wobei Männern häufiger betroffen sind als Frauen. Besonders in Industrieländern tritt das Harnblasenkarzinom zunehmend auf. [11] Bei ungefähr 10–15% aller Patienten liegt bei Erstdiagnose bereits ein metastasiertes Urothelkarzinom vor. [12]

Für die Prognose entscheidend ist die Invasion in die Muskelschicht. Man unterscheidet zwischen nicht muskel-invasiven und muskel-invasiven Tumoren. Daran orientieren sich auch die Therapiemöglichkeiten. [10]

Beim nicht muskel-invasiven Urothelkarzinom wird die transurethrale Blasentumorresektion mit postoperativer intravesikaler Instillation von Chemo- oder Immuntherapeutika angewendet. Bei intermediate und high risk Tumoren kann die Rezidivrate mittels BCG-Therapie gesenkt werden. Dies beschreibt die Instillation der Harnblase mit *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG), welche Granulozyten und Lymphozyten aktiviert und somit durch eine Immunreaktion zur Tumorzellzerstörung führt. Für das muskel-invasive Urothelkarzinom kommt eine (neo)adjuvante Cisplatin-basierte Chemotherapie zum Einsatz sowie eine stadien-angepasste operative Resektion. [13]

Das Therapiemanagement des Urothelkarzinoms hat sich in den letzten Jahren stetig entwickelt, jedoch haben bisher auch neue Ansätze wie beispielsweise die neoadjuvante Chemotherapie vor radikaler Zystektomie nur unwesentlichen Einfluss auf die Prognose von Urothelkarzinompatienten. [12] Nach einer neoadjuvanter Chemotherapie sowie anschließender radikaler Zystektomie kann eine adjuvante Immuntherapie mit einem Immuncheckpoint-Inhibitor erfolgen. [14] Trotz adjuvanter Immuntherapie treten jedoch Rezidive auf. Eine erneuter Reinduktion dieser Therapie wird nicht empfohlen, da eine Platin- oder Immunresistenz wahrscheinlich ist. Überhaupt sprechen lediglich etwa 25% der Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom auf eine Immuntherapie mit *PD-1* Inhibitoren an. In diesem Fall können Patienten eine antikörpergekoppelte Chemotherapie mit Enfortumab-Vedotin erhalten, welches ein Nectin-4-basiertes Antikörper-Wirkstoff-Konjugat ist und im Vergleich zu einer Monochemotherapie in einer randomisierten Phase-3-Studie ein signifikant längeres Gesamtüberleben zeigte. [15, 16]

Durch eine zunehmende Identifikation spezifischer Veränderungen von Tumorsignalwegen kann eine Verbesserung der Lebensqualität und des Überlebens erreicht werden. Beim Urothelkarzinom fielen Mutationen von *FGFR3*, *HRAS* und

*PIK3CA* auf, aus welchen eine Überaktivierung des MAP-Kinase- und des AKT-Signalsweges resultiert. [17] Daher werden bereits zielgerichtete Therapien mit *FGFR3*-Inhibitoren bei Patienten mit muskelinvasivem Urothelkarzinom angeboten, nachdem eine Chemotherapie mit Cisplatin versagt hat. Jedoch kommt es auch bei Therapien gegen den *FGFR3*-Rezeptor häufig zu Resistenzen. Genaue Resistenzmechanismen auch bei der Anwendung von Immuncheckpointinhibitoren sind jedoch noch nicht ausreichend erforscht. Eine Aufdeckung des gesamten Spektrums der Resistenzmechanismen könnte jedoch weitere mögliche Therapieoptionen oder die Möglichkeit zu Kombinationstherapien darlegen. [18] In invasiven Karzinomen treten häufiger Veränderungen des *RB1*- und *p53*-Regulationssystems mit direktem Einfluss auf die Kontrolle des Zellzyklus auf. Epigenetische Mechanismen spielen bei der Regulation von Zielgenen für tumorspezifische Signalwege eine essentielle Rolle, jedoch sind diese bisher nicht vollständig erforscht. Daher ist die Untersuchung epigenetischer Mechanismen von essentieller Bedeutung für die Entwicklung zielgerichteter Therapien beim Urothelkarzinom. [17]

## 1.3 Epigenetik

### 1.3.1 Definition

Die Epigenetik beschäftigt sich mit vererbaren Eigenschaften von Zellen oder Organismen, die ohne Veränderung von DNA-Sequenzen zu unterschiedlichen zellulären Phänotypen führen kann. Zu epigenetischen Mechanismen zählen u.a. die DNA-Methylierung, die Regulation durch microRNA sowie die Veränderung der Chromatinstruktur durch verschiedene Histonmodifikationen. [19] Epigenetische Mechanismen kontrollieren somit die Transkription von Genen und können so Einfluss auf Signaltransduktionswege und die Regulation des Zellzyklus nehmen, z.B. durch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Auch im Urothelkarzinom tragen epigenetische Veränderungen erheblich zur Pathogenese bei. [20] Neben ausgeprägter globaler DNA-Hypomethylierung und fokaler DNA-Hypermethylierung sind einige Chromatinregulatoren häufig von Genmutationen betroffen. [21, 22]

### 1.3.2 Epigenetische Inhibitoren

Vor allem die Methylierung und Demethylierung von DNA in Genpromotorregionen sowie die Veränderung der Chromatinstruktur durch die Acetylierung von Histonen spielen als epigenetische Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription. Histon-Acetyltransferasen (HAT) katalysieren die Anlagerung von Acetylgruppen an Lysinreste in den Histonschwänzen und sorgen durch eine Entspannung der Chromatinstruktur für eine vermehrte Zugänglichkeit für Transkriptionskomplexe sowie die Rekrutierung von Transkriptions-Cofaktoren. Histondeacetylasen (HDAC) hingegen hemmen durch das Entfernen von

Acetylgruppen von den Histonschwänzen die Transkription (siehe Abbildung 1.1). Damit nehmen sie u.a. Einfluss auf den Zellzyklus und die Apoptose.

Bei einigen Tumorarten, so auch beim Urothelkarzinom, findet man eine Überexpression von HDACs und eine Herabregulation oder Mutation von HATs. Daher könnten HDAC-Inhibitoren (HDACi) ein sinnvoller Therapieansatz beim Urothelkarzinom sein. HDACi induzieren häufig eine Hemmung des Tumorzellwachstums sowie Apoptose. [17, 23, 24] Auf molekularer Ebene verhindern HDACi, dass durch HDACs Acetylgruppen abgespalten werden. Daraus resultiert eine vermehrte Acetylierung und somit eine Aktivierung der DNA Transkription. HDACi lassen sich in fünf Strukturklassen unterteilen (Hydroxamate, zyklische Peptide, aliphatische Säuren, Benzamine und elektrophile Ketone), wobei Romidepsin als zyklisches Peptid HDACs der Klasse I stark hemmt. Diese sind bei diversen malignen Erkrankungen überexprimiert und korrelieren häufig mit einer schlechten Prognose. [25]

Der HDACi Romidepsin findet als selektiver Inhibitor der Histondeacetylasen der Klasse I bereits klinische Anwendung in der Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms. [23]

Die DNA-Methylierung an CpG-Dinukleotiden ist einer der am weitesten erforschten epigenetischen Mechanismen, da sie maßgeblich an der Regulation der Transkription beteiligt ist. [21] Mittels DNA-Methyltransferase (DNMT) wird eine Methylgruppe auf ein Kohlenstoffatom der Base Cytosin übertragen. Eine Aneinanderreihung von CpG Dinukleotiden in einem Genomabschnitt wird auch als CpG-Insel bezeichnet, welche häufig in Promotornähe vorzufinden sind. Eine DNA-Hypermethylierung an solchen CpG-Inseln führt zu einer finalen Inaktivierung der Transkriptionsaktivität. Durch Inhibitoren der DNA-Methyltransferasen (DNMTi) kann über mehrere Replikationszyklen hinweg eine passive Demethylierung erzielt werden. [26]

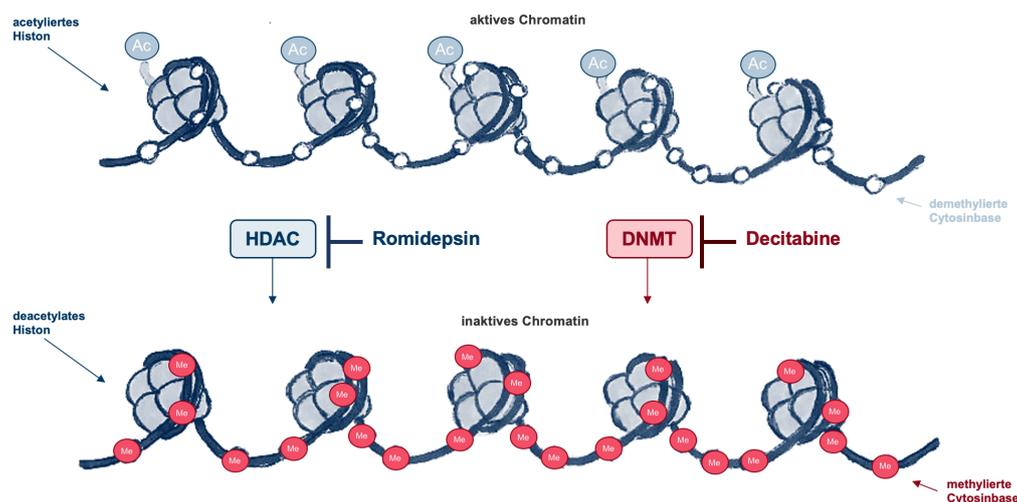
DNMTi sind bereits für die Behandlung von hämatologischen Tumorerkrankungen wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) und des myelodysplastischen Syndroms (MDS) zugelassen mit dem Ziel der Reaktivierung von z.B. Tumorsuppressorgenen, welche durch Promotor-Hypermethylierung stillgelegt wurden. [27, 28]

Epigenetische Inhibitoren tragen jedoch nicht nur dazu bei, dass pathologisch stumm gelegte Gene wieder verstärkt exprimiert werden können, sondern beeinflussen ein weiteres Spektrum zellulärer Prozesse, welche die Tumorprogression und Tumormikroumgebung beeinflussen. Hierzu zählen neben der Regulierung des Zellzyklusses auch die DNA-Schadensreaktion, Zelladhäsion, Angiogenese und Immunreaktion.

Die zelluläre Immunantwort beruht darauf, dass Tumorzellen Antigene präsentieren, welche von Antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Makrophagen eingefangen, verarbeitet und auf den Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) der Klasse I oder II geladen werden. Diese aktivieren wiederum zytotoxische T-Zellen in den Lymphknoten, welche zum Tumor migrieren und das Tumorbett infiltrieren. Durch Interaktion zwischen dem T-Zell-Rezeptor und den MHC-Klasse I spezifischen

Antigenen einer Krebszelle kann diese erkannt und elimiert werden. Dabei werden zusätzliche Antigene frei, die die Immunantwort weiter stimulieren. Dieser Vorgang ist bei Tumoren an unterschiedlichen Stellen z.B. durch eine reduzierte Expression tumorassoziierter Antigene, eine fehlende Antigenpräsentation oder Resistenz gegenüber Apoptoseinduktion gestört, sodass eine Elimination durch das Immunsystem erschwert oder gar unmöglich wird. Auch diese Prozesse werden epigenetisch reguliert, sodass eine Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren ggf. die Eliminierung von Tumorzellen durch die zelluläre Immunantwort verbessern könnte. Die Effektivität der Tumor-Immunantwort hängt auch von der Balance zwischen immunsupprimierenden – und aktivierenden Zytokinen ab, die ebenfalls epigenetisch reguliert ist. Zytokine wie Interleukin (IL)-10 und transformierender Wachstumsfaktor- $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) hemmen die Proliferation, Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen. [28]

Daher soll im Rahmen dieser Arbeit die Wirkung epigenetischer Inhibitoren auf Mediatormoleküle der T-Zellinteraktion, NK-Zellinteraktion und Chemokinausschüttung untersucht werden.



**Abbildung 1.1: Übersicht über die Wirkung von Histondeacetylasen (HDAC) und DNA-Methyltransferasen (DNMT)**

Quelle: eigene Darstellung

## 1.4 Komponenten des Immunphänotyps

Wie bereits oben beschrieben können bei einigen Krebsarten die Tumorzellen der zellulären Immunantwort entgehen, so dass sie nicht erkannt und vernichtet werden. Neben einer verminderten Antigenpräsentation und einem für Immunzellen feindlichen Mikromilieu kann auch die veränderte Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen über Liganden und Rezeptoren (Immunphänotyp) ursächlich sein. Auch dies kann zur Inaktivierung von z.B. T-Zellen führen. [29]



lich, um dendritische Zellen zu rekrutieren. Daraufhin kann das vom Tumor stammende Antigen präsentiert werden, sodass dieser von T-Zellen erkannt wird. [29, 30]

Um Krebszellen zu zerstören, müssen zytotoxische T-Zellen zunächst zum Tumorgewebe vordringen. Zudem gibt es Regulationsmechanismen über die Tumorzellen T-Zellen inaktivieren können.

Verschiedene von Tumorzellen exprimierte Liganden binden an Zelloberflächenrezeptoren von Immunzellen und lösen Signalkaskaden aus, welche die Immunzellen inaktivieren oder eine Toleranzentwicklung bezüglich der Tumorzellen bewirken. Die Bindung des T-Zell-Oberflächenrezeptors *Programmed Cell Death 1 (PD-1)* an den co-inhibitorischen Rezeptor *Programmed Death Ligand 1 oder 2 (PD-L1, PD-L2)* auf Tumorzellen hemmt die Proliferation von T-Zellen und die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie zum Beispiel dem Tumornekrosefaktor alpha (*TNF- $\alpha$* ) und Interleukin-1 (*IL-1*), was zu einer T-Zell-Dysfunktion oder Apoptose führt. Bindet also ein T-Zell-Oberflächenrezeptor an den Liganden *PD-L1* oder *PD-L2* auf der Tumorzelle (siehe Abbildung 1.2), so resultiert daraus eine T-Zelldeaktivierung, sodass die Tumorzelle vom Immunsystem nicht elimiert werden kann. [31]

In weiteres Molekül, das die Aktivität von T-Zellen regulieren kann ist *ICAM-1*. Es ist ein Adhäsionsmolekül, das auf der Zelloberfläche von Endothel-, Epithel- und Immunzellen präsentiert wird und z.B. im Rahmen einer Entzündungsreaktion Leukozyten rekrutiert. Bindet der Ligand, das *Lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)*, wird die Leukozytenwanderung zum Zielort stimuliert. *ICAM-1* wird in vielen Zelltypen bei Entzündungsreaktionen induziert und somit nicht nur an der Leukozytenwanderung, sondern auch an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt. Wird *ICAM-1* von dendritischen oder natürlichen Killerzellen exprimiert, trägt dies zur Bindung von T-Lymphozyten und der Bildung von Immunsynapsen bei. [32]

Die Eliminierung von Tumorzellen beruht auch auf dem extrinsischen Apoptose-signalweg. Das Zelloberflächenprotein *CD-95* bzw. der *FAS-Rezeptor (FAS-R)* gehört zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren und kann durch Bindung an den seinen Liganden (*CD95L*) Apoptose einleiten. Bindet also der *CD95* Ligand, der z.B. von T-Zellen sezerniert werden kann an den *FAS-Rezeptor* der Tumorzelle, führt dies zur Elimination der Tumorzelle. [33]

Da sowohl eine vermehrte Expression des *FAS-R* als auch von *ICAM-1* durch Bindung an den entsprechenden T-Zellliganden eine natürliche Immunantwort stimulieren, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Behandlung der Tumorzellen mit epigenetischen Inhibitoren eine vermehrte Expression dieser Moleküle auf der Tumorzelle bewirken kann.

### 1.4.2 NK-Zell Interaktion

Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sind Effektor-Lymphozyten des angeborenen Immunsystems, die die Ausbreitung von mikrobiellen Infektionen verhindern sollen aber auch an der zellulären Immunantwort gegen Tumorzellen beteiligt sind. Durch Interaktionen von NK-Zellen mit dendritischen Zellen, Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen können Immunreaktionen begrenzt oder verstärkt werden. Insgesamt umfasst das Erkennungssystem der NK-Zellen eine Vielzahl von aktivierenden und hemmenden Zelloberflächenrezeptoren, welche die Funktion der NK-Zellen steuert und angibt, ob eine Zielzelle eliminiert werden soll oder nicht. [34]

Bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort spielt der aktivierende Immunrezeptor *NKG2D* (*Natural Killer Group 2, Member D*) und seine Liganden eine wichtige Rolle. Der *NKG2D*-Ligand UL16-bindendes Protein 3 (*ULBP3*) wird auf bestimmten epithelialen Tumorzellen vermehrt exprimiert. Damit stellt *ULBP3* ein potenzielles therapeutisches Ziel zur Verbesserung der Immunantwort dar, da es die Immunüberwachung von Tumoren stimuliert. [35]

### 1.4.3 Chemokine

Chemokine sind Proteine, die durch die Induktion von Chemotaxis, Gewebsextravasation und der Differenzierung von Immunzellen eine wichtige Rolle bei der Anti-Tumor-Immunantwort spielen. Noch ist unklar, weshalb die Immuntherapie bei manchen Krebspatienten greift und bei manchen nicht. Die *CXCL9, -10, -11/CXCR3*-Achse reguliert beispielsweise über eine parakrine Achse die Migration, Differenzierung und Aktivierung von Immunzellen und führt somit zu einer Tumorunterdrückung. Dies geschieht durch die Rekrutierung von Immunzellen wie zytotoxischen T-Lymphozyten, natürlichen Killerzellen und Makrophagen. Eine hohe Infiltrationsrate von Lymphozyten am Tumor kann ein Ansprechen auf Checkpoint-Inhibitoren verbessern. Andererseits gibt es Hinweise für eine weitere autokrine Achse, welche möglicherweise am Tumorstadium und der Metastasierung beteiligt ist. Um eine wirksame Antitumorthherapie zu entwickeln, ist daher ein besseres Verständnis und eine weitere Forschung der *CXCL9, -10, -11/CXCR3*-Achse in der Tumormikroumgebung notwendig. [36]

Da Chemokine als Entzündungsmediatoren gelten, werden durch Interferon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) als Teil eines komplexen Netzwerks von Entzündungsmediatoren die Liganden *CXCL9, CXCL10* und *CXCL11* induziert, welche an den *C-X-C motif receptor 3* (*CXCR3*) binden und dadurch zytotoxische T-Zellen und aktive T1-Helferzellen anlocken. Auch *CCL5* ist für die Chemotaxis und Infiltration von T-Zellen von Bedeutung. [37] In Studien zum kolorektalen Karzinom wurden u.a. die Chemokine *CXCL10, CCL2, CCL5* sowie das Adhäsionsmolekül 1 (*ICAM-1*, siehe 1.4.1) durch das Erreichen einer höheren T-Zelldichte in bestimmten Tumorregionen mit einem besseren Überleben assoziiert. [38] daher sollte in dieser Arbeit die Auswirkung einer Behandlung von Tumorzellen mit epigenetischen Inhibitoren auf die Expression der Chemokine *CCL2, CCL5, CXCL10* sowie *CXCL11*

näher untersucht. Entsprechende Expressionsveränderungen könnten die häufig mangelnde Rekrutierung und Infiltration von T-Zellen in Tumorgeweben beeinflussen.

#### 1.4.4 Viral Mimicry

Ein weiterer Mechanismus, der die Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem regulieren kann ist die sog. *Viral Mimicry*. Das Phänomen der *Viral Mimicry* meint, dass bestimmte Stimuli als virale Infektion von Zellen interpretiert werden, so dass eine antivirale Immunantwort induziert wird, welche eine Tumorzelle wie eine virusinfizierte Zelle erkennt und vernichtet. [39, 40]. Dieser Stimulus wird durch eine aberrante Reaktivierung von endogenen, stillgelegten Retrovirussequenzen erreicht. Endogene Retroviren werden normalerweise durch DNA-Methylierung inaktiviert. Durch globale DNA-Hypomethylierung in einigen Tumorarten können solche Sequenzelemente reaktiviert werden. Dies kann entsprechend auch künstlich durch die Gabe von DNMTi erreicht werden. So konnte gezeigt werden, dass hypomethylierende Substanzen wie z.B. 5-Azacytidine bereits in niedriger Dosierung die Expression von humanen endogenen Retroviren wieder aktivieren und folglich eine Transkription induzieren, welche zur Bildung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) als Stimulus für die *Viral Mimicry* führt. Dadurch wird der MDA5/MAVS-RNA-Erkennungsweg aktiviert und anschließend *Interferon responsive Genes* (IRFs) wie z.B. IRF7 aktiviert. [40] Dies führt zu einer Transkription von Typ-I-Interferonen (z.B. IFN- $\beta$ ), welche die virale Replikation regulieren [41] und das *Signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1)-Protein aktivieren. [42] Die *Janus kinase signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT)-Signalkaskade führt wiederum zur Expression von zahlreichen *IFN-stimulated Genes* (ISGs), welche eine virale Infektion in der infizierten Zelle kontrollieren und durch die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen mit benachbarten Zellen kommunizieren. [43] Zu den ISGs zählt auch das *2'-5'-oligoadenylate synthetases-like protein* (OASL), welches während einer Infektion die Replikation von RNA-Viren unterdrückt. [41] IFI44 stellt ein weiteres ISG dar. Dieses hat als zytoplasmatisches Protein eine antiproliferative Wirkung nach einer viralen Infektion. [44]

Um die Frage zu klären, ob eine Behandlung von Tumorzellen mit epigenetischen Inhibitoren den *Viral Mimicry* Signalweg verstärken könnte und somit zu einer besseren Erkennung der Tumorzelle durch das Immunsystem beitragen könnte, wurden STAT1, IFI44 und OASL als Endprodukte des *Viral Mimicry* Signalwegs in dieser Arbeit untersucht.

## 1.5 Chimäre Antigenrezeptoren in der Tumorthherapie

Ein weiterer therapeutischer Ansatz zur Verstärkung der Immunantwort gegen Tumorzellen ist die adoptive T-Zell-Therapie mit chimären Antigenrezeptoren

(CAR-T). Diese werden bereits erfolgreich bei Malignitäten des hämatopoetischen Systems eingesetzt werden und sind für weitere Tumorentitäten in der Entwicklung. CARs sind modifizierte Rezeptoren, welche Immunzellen (insbesondere T-Zellen) gegen spezifische Zielstrukturen richten und somit die Erkennung von Krebszellen durch das Immunsystem verbessern. Dazu werden zunächst T-Zellen aus dem Blut des Patienten isoliert und lentiviral transduziert, so dass die T-Zellen die entsprechenden CARs gegen möglichst tumorspezifische Antigene auf der Zelloberfläche tragen. Diese werden dem Patienten zurück infundiert und greifen nun gezielt die Krebszellen an. Gegen CD19 gerichtete CARs sind bereits für die Behandlung von akuter lymphatischer Leukämie, chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphomen zugelassen. [45] Bisher ist jedoch noch keine breite therapeutische Anwendung möglich, da die biologische Komplexität der Mikroumgebung von soliden Tumoren eine nicht zu vernachlässigende Rolle spielt. [46]

Der monoklonale Antikörper Cetuximab stellt in der Tumorthherapie ein wichtiges Element dar, da er die Domäne III des epithelialen Wachstumsfaktorrezeptors (EGFR) mit hoher Affinität erkennt und viele Tumoren EGFR überexprimieren. Für Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals (HNSCC) wurde daher von den Kooperationspartnern aus dem Forschungslabor der hiesigen HNO-Klinik ein Cetuximab-CAR-Konstrukt entwickelt, welches auf T-Zellen exprimiert wird und bereits eine hohe Reaktivität gegenüber EGFR-positiven HNSCCs und bösartigen Zellen anderer solider Krebsarten zeigte. [47]

Auch gegen CD44v6, eine Isoform des Hyaluronsäure-Rezeptors CD44 wurde von den Kooperationspartnern ein hochspezifisches CAR für HNSCC entwickelt. CD44v6 ist mit der Tumorentstehung, der Invasion von Tumorzellen sowie der Metastasierung in soliden Tumoren assoziiert und dort vermehrt exprimiert. Für das entwickelte CD44v6 CAR-Konstrukt konnte in HNSCC bereits eine direkte Korrelation zwischen der CD44v6-Expression und der Zytotoxizität der CAR-T-Zellen nachgewiesen werden. [48]

In der vorliegenden Arbeit sollten CAR T-Zellen als Zellmodell dienen mit dessen Hilfe untersucht werden sollte, ob durch eine Vorbehandlung von Tumorzellen mit epigenetischen Inhibitoren die Interaktion mit T-Zellen und die nachfolgende Apoptoseinduktion verbessert werden kann. [1]

## 1.6 Ziele der Arbeit

Trotz etablierter Therapiekonzepte für Plattenepithelkarzinome von Kopf und Hals sowie für Urothelkarzinome kommt es häufig zu Rezidiven und Therapieresistenz. Das Versagen von modernen Immuntherapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren beruht auf wahrscheinlich auf zahlreichen Mechanismen, die zur erschweren Erkennung von Tumoren durch das Immunsystem beitragen, die Rekrutierung und Funktionalität der Immunzellen beeinträchtigen oder auch die Interaktion zwischen Tumor- und Immunzellen. In dieser Arbeit sollte untersucht

werden, ob durch eine Vorbehandlung von Tumorzellen beider Entitäten mit epigenetischen Inhibitoren deren Immunphänotyp so verändert werden kann, dass eine bessere Erkennung und Eliminierung von Tumorzellen durch das Immunsystem erreicht werden könnte. Im Detail sollte untersucht werden, inwiefern sich die Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren der DNA-Methylierung und der Histondeacetylierung auf die Expression von Molekülen der T- und NK-Zellinteraktion sowie auf die Expression von Chemokinen auswirkt. Als zelluläres Modell für die Analyse der T-Zell-Interaktion dienten CAR-T-Zellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen Erkenntnisse liefern ob das Patientenansprechen auf die Immuntherapie mit Immuncheckpoint-Inhibitoren durch eine Kombinationsbehandlung mit epigenetischen Inhibitoren verbessert werden könnte.

## 2 Material

### 2.1 Zelllinien

*Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten kommerziellen Zelllinien*

<b>Zelllinie</b>	<b>Geschlecht, Alter [Jahre]</b>	<b>Ursprung/ TNM/Grading</b>	<b>Referenz</b>
<b>BFTC-905</b>	F, 51	Urothelkarzinom, Ta, G3	Tzeng et al. 1996
<b>RT-112</b>	F	Urothelkarzinom, G2	Masters et al. 1986
<b>SW-1710</b>	F, 84	Urothelkarzinom, G3	Kyriazis et al. 1984
<b>UM-UC-3</b>	M	Urothelkarzinom (TCC)	Grossmann et al. 1986
<b>VM-CUB1</b>	M	Urothelkarzinom (TCC)	Williams et al. 1980
<b>HBLAK</b>	M, 80	Urothel	Hoffmann et al. 2016
<b>HEK293</b>	-	Fötus, Niere	Stepaneko et al. 2015
<b>UM-14C</b>	-	Mundhöhle, Rezidiv	Hoffmann et al. 2008
<b>UM-104</b>	M, 56	Mundhöhle (HPV+)	Carey, T., et al. (2012)
<b>UM-74A</b>	M	Zungenboden	Brenner et al. 2010
<b>UT-24A</b>	-	Mundhöhle, T2N0M0	Hoffmann et al. 2008
<b>UT-33</b>	-	Mundhöhle, T2N0M0	Hoffmann et al. 2008

Die UC-Zelllinien wurden von Prof. M.A. Knowles (ICRF Cancer Medicine Research Unit, Leeds UK) und Dr. J. Fogh (Sloan-Kettering Cancer Research Center, Rye, New York USA) oder von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen. Die humane urotheliale und immortalisierte Zelllinie HBLAK wurde von der Firma CELLnTEC (Schweiz) bezogen. Die HNSCC-Zelllinien sowie die Zelllinie HEK293 wurden von Prof. Dr. med. Martin Wagenmann von der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität (Forschungslabor der Klinik für Hals-Nasen und Ohrenheilkunde) zur Verfügung gestellt.

Für die vom HNO-Labor zur Verfügung gestellten humanen CAR-T-Zellen liegt ein Ethikvotum vor (Studennummer: 2019-623). Diese wurden vom HNO-Labor aus peripheren Blut von gesunden freiwilligen Spendern nach Einverständnis generiert.

Alle kultivierten Zelllinien wurden mittels STR-Profiling vom Institut für Rechtsmedizin der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf auf ihre Identität überprüft.

## 2.2 Chemikalien, Reagenzien

**Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien und Reagenzien**

<b>Chemikalien/Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
Bovine Serum Albumin (BSA)	PAN™ BIOTECH	Aidenbach
4'-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich	Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich	Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Luna® universal qPCR Master Mix	New England Bio Labs® Inc.	Ipswich, MA, USA
MACSQuant® Laufpuffer	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega	Fitchburg, USA
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)	Gibco	USA
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim
Ethanol	Merck	Darmstadt
FBS (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)	Biochrom AG	Berlin
MTT Reagenz	Sigma-Aldrich	Steinheim
DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	Steinheim
CnT-Prime Epithelial Cell Culture Medium	CellnTec	Schweiz
Trypsin-EDTA 0,25%	Sigma-Aldrich	Steinheim
Versene (1:5000)	Gibco	
Trypanblau	Sigma-Aldrich	Steinheim
StemPro® Accutase®	Gibco	USA
Kollagen IV	Sigma-Aldrich	Steinheim
IMDM Medium (+ 10 % FCS + 1 % L-Glutamin + 1 % P/S)	Sigma-Aldrich	Steinheim
Polyethylenimin (PEI)		
Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (M5655)	Steinheim
FcR Blocking Reagent	Miltenyi Biotec #130-097-047	
CD34 MicroBeads	Miltenyi Biotec #120-007-450	

## 2.3 Molekularbiologische Kits

*Tabelle 2.3: Molekularbiologische Kits*

Kit	Hersteller	Katalog-Nr.
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	20531
RNeasy Mini Kit	Qiagen	74106

## 2.4 Verbrauchsmaterialien

*Tabelle 2.4: Verbrauchsmaterialien*

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Pasteurpipetten	Brand
Stripetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Costar
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Greiner bio-one
6-Well-Platten	Greiner bio-one
96-Well-Platten	Greiner bio-one
Pipettenspitzen	Greiner bio-one
Falcons (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one
Eppendorfgefäße	VWR Chemicals
LightCycler® 480 Multiwellplatte 96	Roche
LightCycler® 480 Siegelfolie	Roche
PS-Röhrchen (5 ml)	Greiner bio-one
1,1 ml Deepwell-Platte mit runden Böden	Starwell
CD3/CD28 beschichtete 6-Well-Platten	BDBiosciences #16-0037-85

## 2.5 Puffer und Lösungen

*Tabelle 2.5: Puffer und Lösungen*

FACS-Puffer	Konzentration
DPBS (pH 7.2)	Ohne Calcium und Magnesium
BSA	0,5 %
EDTA	2 mM

## 2.6 Epigenetische Inhibitoren und Pharmaka

*Tabelle 2.6: Epigenetische Inhibitoren und Pharmaka*

Pharmakon	Hersteller	Katalog-Nr.
Romidepsin, in DMSO gelöst	Sellekchem	S3020

Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine), in DMSO gelöst	Sigma-Aldrich	A3656
Atezolizumab	Sellekchem	A2004

## 2.7 Fluoreszenz-Antikörper und zugehörige Lebend-farbstoffe

**Tabelle 2.7: Farbstoffe zur Unterscheidung von vitalen und avitalen Zellen**

Farbstoff zur Detektion von vitalen und avitalen Zellen	Menge pro Ansatz	Katalog-Nr.	Hersteller
DAPI Staining Solution	6 µl	130-111-570	Miltenyi
PI (Propidiumiodid)	2,5 µl	130-113-007	Miltenyi
Viability™ 405/520 Fixable Dye	1 µl	130-109-814	Miltenyi

**Tabelle 2.8: Fluoreszenz-Antikörper und zugehörige Lebend-/Totfarbstoffe\***

Antikörper	Fluorochrom	Menge/ Ansatz	Katalog-Nr.	Hersteller	Lebend-farbstoff	Inkubation
CD54/ICAM-1	APC	2 µl	130-121-427	Miltenyi	Viability	10 min bei 4°C
CD95/FAS	APC-Vio770	2 µl	130-113-007	Miltenyi	Viability	10 min bei 4°C
CD112	PE-A	10 µl	130-109-001	Miltenyi	Viability	10 min bei 4°C
CD273/PD-L2	APC	20 µl	557926	BD Biosciences	PI	30 min auf Eis
CD274/PD-L1	APC	5 µl	563741	BD Biosciences	PI	30 min auf Eis
CD44v6	PE-Vio770	2 µl	130-111-239	Miltenyi	DAPI	30 min auf Eis
EGFR	PE-A	2 µl	130-110-528	Miltenyi	DAPI	30 min auf Eis
ULBP-3	Alexa647	2,5 µl	FAB1517 R	R&D	Viability	30 min auf Eis
CD155	FITC	2 µl	130-118-997	Miltenyi	Viability	10 min bei 4°C
MICA/B	PE-Vio770-A	2 µl	130-118-832	Miltenyi	Viability	10 min bei 4°C

Die Fluoreszenz-AK wurden im Dunkeln inkubiert.

\*Viability = Viability™ 405/520 Fixable Dye, PI = Propidiumiodid, DAPI = DAPI Staining Solution

## 2.8 Oligonukleotide

**Tabelle 2.9: Oligonukleotide**

Gen	Primername	Sequenz 5'-3'	Tm °C (Sigma)
<b>STAT1</b>	QRT_STAT1_60fwd1	CAAAGTCATGGCTGCTGAGAA	65,4
	QRT_STAT1_60rev1	AGGGCCATCAAGTTCCATTG	66
<b>IFI44</b>	QRT_IFI44_60fwd1	GCCTGTGCAGGGATGACATA	66,1
	QRT_IFI44_60rev1	TTCAGCGATGGGAATCAAT	66,5
<b>OASL</b>	QRT_OASL_60fwd1	CCACTGTGATGGACCTGCTC	65,9
	QRT_OASL_60rev1	GCCGGATCCAGGATGATG	66,7
<b>CXCL11</b>	QRT_CXCL11_60fwd2	TGAGTGTGAAGGGCATGGCT	68,2
	QRT_CXCL11_60rev2	GCGTCCTCTTTTGAACATGGG	67,7
<b>CXCL10</b>	QRT_CXCL10_60fwd2	ACTGCCATTCTGATTTGCTGC	66,4
	QRT_CXCL10_60rev2	GATGCAGGTACAGCGTACAGTTCTA	65,2
<b>CXCL9</b>	QRT_CXCL9_60fwd2	GCTGGTTCTGATTGGAGTGC	64,8
	QRT_CXCL9_60rev2	TTCTCGCAGGAAGGGCTTGG	70,8
<b>CCL5</b>	QRT_CCL5_60fwd2	AGCCCTCGCTGTCATCCTC	66,9
	QRT_CCL5_60rev2	GGGCAATGTAGGCAAAGCAG	66,7
<b>CCL2</b>	QRT_CCL2_60fwd2	GCCACCTTCATTCCCAAG	66,7
	QRT_CCL2_60rev2	TGGGACACTTGCTGCTGGT	67,1

Alle Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert und bei einer Annealing-Temperatur von 60°C im Zweitschrittprogramm verwendet.

## 2.9 Geräte

**Tabelle 2.10: Geräte**

Gerät	Hersteller	Nutzung
LightCycler® 96	Roche	qRT-PCR
MACSQuantAnalyzer 10	Miltenyi Biotec	FACS-Analyse
Centrifuge 5418	Eppendorf	Tischzentrifuge
Centrifuge 5810	Eppendorf	Zellkultur-Zentrifuge
iMark™ Microplate Reader	Bio-Rad	Plattenlesegerät
Heracell™ 150i	Thermo Scientific	Inkubator
NanoDrop 2000/2000c	Thermo Scientific	Bestimmung des RNA-Gehalts
GFL® 1083	Burgwedel	Heizbad
Eclipse TE2000-S	Nikon	Lichtmikroskop
Pipetus®	Hirschmann	Pipette-Boy
Pipetten	Eppendorf	universell

## 2.10 Software

*Tabelle 2.11: Software*

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Standort</b>
<b>Endnote</b>	Clarivate Analytics	u.a. London, UK
<b>LightCycler® 96 Software</b>	Roche	Basel, Schweiz
<b>MACS Quant Software</b>	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
<b>NanoDrop 2000/2000c</b>	Thermo Scientific	Oberhausen
<b>FlowJo</b>	BD Biosciences	San Jose, CA
<b>Graph Pad Prism9*</b>	GraphPad Software	San Diego, CA

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Kultivierung der UC- und HNSCC-Zelllinien**

Alle UC- und HNSCC-Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in glucosehaltigem DMEM-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurden die UC-Zellen mit DPBS und die HNSCC-Zellen mit Versene gewaschen und beide anschließend mit 1 ml (T25-Zellkulturflasche) oder 2 ml Trypsin (T75-Zellkulturflasche) abgelöst. Durch das FCS-haltige Medium wurde das Trypsin gestoppt, nachdem sich alle Zellen abgelöst hatten. Insgesamt wurden die HNSCC-Zelllinien in niedrigerem Verhältnis (unter 1:10) passagiert als die UC-Zelllinien (1:10 bis 1:25).

#### **3.1.2 Kultivierung der immortalisierten Urothelzelllinie HBLAK**

Die normale (immortalisierte) Urothelzelllinie HBLAK wurde ebenfalls bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, jedoch in CnT-Prime Epithelkulturmedium kultiviert. Nach Abnahme des Mediums wurde auch diese Zelllinie mit DPBS gewaschen, jedoch mit 2 ml Accutase abgelöst. Nach Ablösen der Zellen und Zugabe von 4 ml CnT-Medium wurde die Zellsuspension 5 min bei 300 rcf zentrifugiert und anschließend das überschüssige Medium abgenommen. Nun konnten die übrigen Zellen im Verhältnis 1:5 in eine neue bereits mit Kollagen IV beschichtete T75-Zellkulturflasche umgesetzt. Die Kultivierung in T25-Zellkulturflaschen konnte nach 30 min vorher durchgeführter Beschichtung mit Kollagen IV-Lyophilisat (1:20 verdünnt in 0,1%iger Essigsäure) und zwei anschließenden Waschvorgängen mit DPBS erfolgen.

#### **3.1.3 Zellzahlbestimmung**

Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte nach Zugabe von Trypanblau zur Zellsuspension im Verhältnis 1:1 durch den automatischen Zellzähler.

#### **3.1.4 Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren**

Einen Tag vor der Behandlung wurden jeweils 150.000 Zellen/Well der UC- und HNSCC-Zellen sowie der Urothelzelllinie HBLAK in 6-Well-Platten ausgesät. Für die HNSCC-Zelllinie UT-33 wurde aufgrund der Morphologie (morphologisch größere, aber dafür weniger Zellen) die doppelte Zellzahl benötigt. Am Folgetag erfolgte die Behandlung mit entweder einmaliger Gabe von 3 nM Romidepsin (HNSCC nur mit 1 bis 3 nM Romidepsin) oder dreitägiger Zugabe von 100 nM Decitabine nach vorherigem Mediumwechsel. Inkubiert wurden die Zellen nach Romidepsin-Behandlung für 72 Stunden und nach Decitabine-Behandlung für sieben Tage nach dreitägiger Behandlung bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank.

Für die Lösungsmittelkontrolle erfolgte jeweils eine äquivalente Dosisgabe des Lösungsmittels DMSO.

### **3.1.5 Behandlung mit Atezolizumab**

Die Behandlung mit dem PD-L1 Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab erfolgte nach Aussaat im 96-Well-Format mit 10 µg oder 100 µg in Kombination mit vorheriger Romidepsin-Behandlung (3 nM) oder DMSO-Gabe. Die Inkubationszeit betrug 16 Stunden bzw. vier Stunden.

## **3.2 RNA-Extraktion**

Die RNA-Extraktion für die RNA-Sequenzierung erfolgte nach Aussaat und Behandlung der Zelllinien in 6-Well-Platten mit dem „RNeasy Mini Kit“ nach Herstellerangaben mit DNase-Verdau. Alle Proben wurden in 80 µl RNase freiem Wasser eluiert.

## **3.3 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese wurde mithilfe des QuantiTect Reverse Transcription Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

## **3.4 Quantitative Realtime-PCR**

Die quantitative Real-Time-PCR (Echtzeit-Polymerasekettenreaktion) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren und dient außerdem der Quantifizierung. Als fluoreszierender Farbstoff wurde hier SYBR Green verwendet, welcher in doppelsträngige DNA interkaliert. Die zunehmende Menge des Amplifikats kann so nach jedem Zyklus durch Messung des Fluoreszenzsignals quantifiziert werden. Für jede PCR wurde mithilfe einer Referenzprobe, welche eine starke Genexpression für die Ziel-Sequenz aufwies, eine Standardkurve mit einer Verdünnungsreihe (1:20, 1:200, 1:2000) erstellt, um unbekannte Proben ebenfalls quantifizieren zu können. Die Standardkurve diente außerdem der Beurteilung wie effizient die qPCR ist. Anhand der Schmelzkurve, welche lediglich aus einem Peak bestehen sollte, konnte die Spezifität der PCR zusätzlich beurteilt werden. Für jede PCR wurde ein Triplikat reines H<sub>2</sub>O als Kontaminationskontrolle mitgeführt. Als Referenzgen wurde das „Housekeeper-Gen“ TBP verwendet, durch dessen Messung Unterschiede in der Qualität oder Menge der eingesetzten cDNA relativiert werden sollen, da für das Housekeeper-Gen angenommen wird, dass es in der Regel in allen Proben etwa gleich stark exprimiert wird. Die 96-Well-Platten wurden mithilfe des LightCycler®96 der Firma Roche in drei Phasen gemessen: Während der ersten Phase findet die Denaturierung statt, in der zweiten Phase das Anlagern der Primer (Temperatur siehe Tabelle 2.9) und dann

die Elongation. Insgesamt wurden für jede Probe Triplikate pipettiert und jedes Well enthält den in Tabelle 3.1 dargestellten Reaktionsansatz.

**Tabelle 3.1: Reaktionsansatz pro Well (Gesamtvolumen 20 µl/Well)**

Komponente	Volumen/Well
2x SYBR-Green	10 µl
Primer forward (1:10/10 µM)	0,5 µl
Primer reverse (1:10/10 µM)	0,5 µl
H2O	7 µl
cDNA (1:20 verdünnt)	2 µl

### 3.5 MTT-Test

Zur Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes von Romidepsin für HNSCC Zelllinien wurde ein MTT-Viabilitätstest durchgeführt. Die Zelllinien wurden in 96-Well-Platten ausgesät und am Folgetag einmalig mit Wirkstoffkonzentrationen von 0.5 bis 5 nM Romidepsin behandelt. 72h später wurden 10 µl Methylthiazolyldiphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) pro Well zugegeben. Nach ausreichender Färbung (etwa nach 3-4 Stunden) wurde das MTT verworfen und 50 µl DMSO pro Well zugegeben. Die Messung erfolgte mit dem iMark™ Microplate Reader (Wellenlänge 595nm und 750nm), die Auswertung mittels GraphPad Prism.

### 3.6 Durchflusszytometrie (FACS)

FACS steht für *fluorescence activated cell sorting* und ist ein zytometrisches Verfahren, welches Zellen analysiert, die an einem Laserstrahl vorbeifließen. Durch den Laser werden Fluorophore angeregt, welche von einem Detektor ausgewertet werden. Somit lassen sich quantitative Informationen über jede analysierte Zelle treffen.

Für die FACS-Antikörperfärbung wurden die Zellen wie bereits in 3.1.3 beschrieben behandelt und ausgesät.

Am Messtag wurden die Zellen mit 0,5 ml Trypsin pro Well abgelöst und nach Abstoppen durch das DMEM-Medium, welches 10% FCS enthält, auf die jeweiligen FACS-Färbeansätze verteilt. Für jede Zelllinie wurden vier Proben gemessen: gefärbte /ungefärbte DMSO-Kontrolle und gefärbte/ungefärbte Probe behandelter Tumorzellen. Nach dem Ablösen aus den 6-Well-Platten und Abstoppen durch das im Medium enthaltende FCS, wurde die Zellsuspension in die entsprechenden Reagenzgefäße gegeben und für 5 min bei 300 rcf zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer mit entsprechender Antikörpermenge resuspendiert (Eine Auflistung von Antikörpermenge und Lebendfarbstoff findet sich in Tabelle 2.8). Zusätzlich erfolgte die Zugabe eines Farbstoffes (PI, DAPI oder Viobility), um nicht-vitale Zellen von vitalen

unterscheiden zu können. Welcher Fluoreszenzantikörper mit welchem Lebendfarbstoff gekoppelt werden kann, hängt von den jeweiligen Absorptionsmaxima ab. Diese sollten möglichst weit auseinander liegen, um sich nicht zu überschneiden. Um dennoch minimale Überschneidungen zu minimieren, fand vorher eine Kompensation am FACS statt.

Die Inkubationszeiten der Fluoreszenzantikörper können ebenfalls Tabelle 2.8 entnommen werden. Da es sich um fluoreszierende Antikörperfärbungen handelte, erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Im Anschluss wurden pro Reagenz noch 1 ml FACS-Puffer zugegeben und die Proben für 10 min bei 300 rcf zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das zurückbleibende Zellpellet final mit 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Mit dem MACSQuant® Analyzer 10 wurden die Proben gemessen und anschließend mit der Software FlowJo ausgewertet. Dazu wurden zunächst avitale Zellen herausgefiltert. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) sowie die Prozentzahl der positiv gefärbten Zellen wurde ermittelt. Die Graphik zum Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität mit Vergleich der Romidepsin- und Decitabine-Behandlung sowie der DMSO-Kontrolle wurde mittels Graphpad erstellt. Für die Abbildungen der Grundexpression von Oberflächenproteinen wurde die y-Achse zur einheitlicheren Darstellung auf 100 normalisiert. Die Versuchsreihen wurden mehrfach zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, um repräsentative Ergebnisse zu erhalten.

### **3.7 Zytotoxizitäts-Test nach Kokultivierung von CAR-T-Zellen mit UC-Zelllinien**

Um die cytotoxische Lyse-Effizienz von CAR-T-Zellen gegenüber Tumorzellen zu überprüfen, wurden in Kooperation mit dem Forschungslabor der HNO-Klinik gegen EGFR und CD44v6 gerichtete CAR-T-Zellen mit den ausgewählten Urothelkarzinomzelllinien UMUC-3, RT-112 und BFTC-905 kokultiviert. Die Urothelkarzinomzellen wurden zuvor mit epigenetischen Inhibitoren vorbehandelt. Die CAR-T-Zellen wurden vom HNO-Labor generiert und zur Verfügung gestellt. Nachfolgend wird kurz zusammengefasst nach welchem Protokoll die CAR-T-Zellen dort hergestellt wurden:

#### **3.7.1 Herstellung von CAR-T-Zellen**

Aus dem peripheren Blut freiwilliger gesunder Spender (Ethikvotum #2019-623) wurden die mononukleären Zellen (PBMC-Schicht) mittels Ficoll-Paque im Forschungslabor der HNO-Klinik gewonnen. Die isolierten T-Zellen wurden in CD3/CD28 beschichtete 6-Well-Platten mit IMDM-Medium gegeben. Das IMDM-Medium für die Kultivierung der humanen T-Zellen enthielt 10 % FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 100 u/ml Interleukin-2, um das Wachstum der T-Zellen zu stimulieren.

Parallel erfolgte im S2-Labor der HNO-Klinik die Virus-Produktion für die entsprechenden CARs. Dazu wurden HEK(293T)-Zellen jeweils mit entsprechenden Plasmid-PEI-Mixen transfiziert.

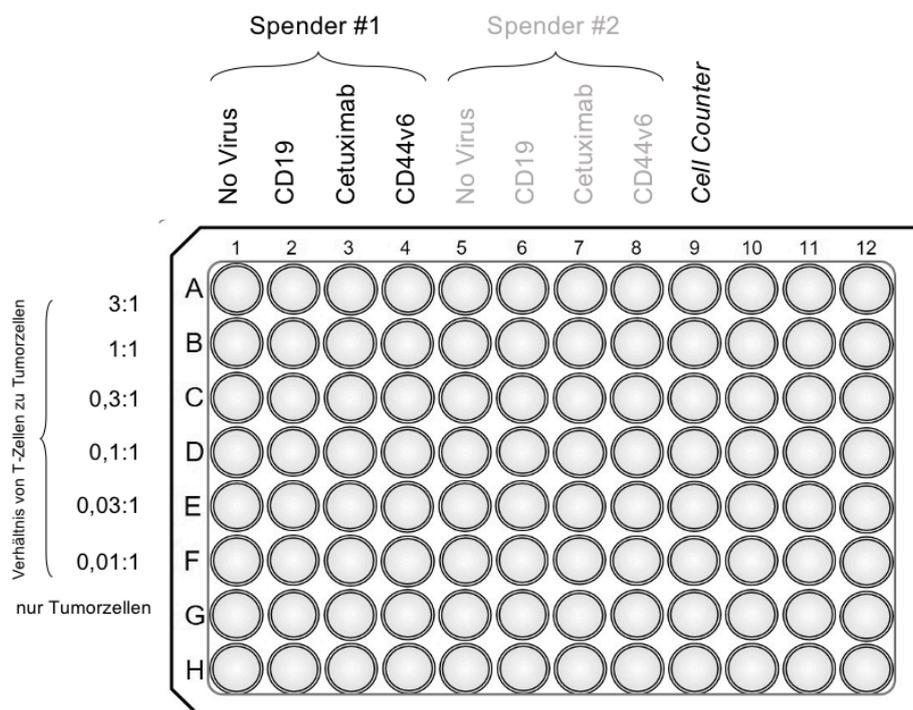
Mit den hergestellten Viruspartikeln konnte anschließend die lentivirale Transduktion der T-Zellen im S2-Labor der HNO-Klinik durchgeführt werden. Hierzu wurden die humanen T-Zellen von den mit CD3/CD28 beschichteten 6-Well-Platten geerntet und in Falcons überführt. Die Transduktion erfolgte in 6-Well-Platten mit 500 µl T-Zellen in IMDM-Medium (+ 500 u/ml IL-2 für T-Zellwachstum), 25 µl Protaminphosphat, damit sich die Viren besser an die T-Zellen anlagern und 2 ml des jeweiligen Virusüberstandes (CD19, Cetuximab oder CD44v6) pro Well. Für eine *No Virus* Kontrolle wurde ausschließlich IMDM-Medium verwendet. Die Inkubation erfolgte 24h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Anschließend wurden die erfolgreich transduzierten T-Zellen mit Hilfe der MACS-Technologie der Firma Miltenyi magnetisch aufgereinigt. .

Die CARs tragen in der Hinge-Region eine trunkierte Form von CD34 und können darüber mit Hilfe eines Antikörper-Bead-Komplexes und einer magnetischen Säule angereichert werden. Die aufgereinigten CAR-T-zellen wurden bis zu weiteren Verwendung in IMDM-Medium (mit 10% FCS, 1% L-Glutamin + 1% Penicillin/Streptomycin sowie IL-2) kultiviert. bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

### 3.7.2 Aussaat und Behandlung der UC-Zelllinien

Die Zelllinien UMUC-3, BFTC-905 und RT-112 wurden ebenfalls an dem Tag, an dem die lentivirale Transduktion der T-Zellen stattfand, in 96-Well-Platten in 100 µl Zellsuspension (DMEM + 10% FCS)/ Well ausgesät. Pro Well betrug die Zellzahl für die UC-Zelllinien UMUC-3, BFTC-905 und RT-112 jeweils 10.000 Zellen. Da für die DMSO-Kontrollen eingeringerer Killing-Effekt durch Romidepsin erwartet wurde, wurde für die vorgesehenen 96-Well-Platten jeweils die Hälfte der Zellen (5.000 Zellen) ausgesät. Pro 96-Well-Platte waren pro T-Zell-Spender vier Spalten sowie eine Spalte zur Ermittlung der Zellzahl (CellCounter) nötig. Für die Verdünnungsreihen der unterschiedlichen Verhältnisse von Tumorzellen und T-Zellen wurden sechs Reihen berechnet, sowie eine zusätzliche Reihe, welche ausschließlich Tumorzellen enthielt. Die unterste Reihe wurde freigelassen, da diese als „blanks“ für die Subtraktion des Substrates verwendet wurde. 24h später wurden die ausgesäten Zellen mit 3 nM Romidepsin oder entsprechender Konzentration des Lösungsmittels DMSO behandelt. Für jeden Ansatz gab es zwei unterschiedliche Spender für T-Zellen.

### 3.7.3 Ansetzen des Zytotoxizitäts-Tests



**Abbildung 3.1: Pipettier-Schema für die Aussaat und das Ansetzen des Viabilitätsassays nach Kokultivierung von T-Zellen mit Tumorzellen. Die T-Zellen enthielten CARs für CD19, Cetuximab und CD44v6. Eine Kontrolle wurde nicht mit einem Virus transfiziert (No Virus).**

Mit dem Ansetzen des Zytotoxizitäts-Tests erfolgte die Kokultivierung der ausgesäten und Inhibitor-vorbehandelten Zelllinien mit den vom HNO-Labor zur Verfügung gestellten CAR-T-Zellen. Zunächst wurden sowohl die in 96-Well-Platten ausgesäten Tumorzellen gezählt, als auch die CAR-T-Zellen. Die entsprechenden Verdünnungsreihen wurden in Deep Well Platten angesetzt (siehe Abbildung 3.1), beginnend mit dem Verhältnis 3:1 von T-Zellen und Tumorzellen. Dazu wurde die benötigte T-Zellzahl berechnet, zentrifugiert und in 1.000 µl IMDM-Medium (+ 10 % FCS und P/S, ohne IL-2) resuspendiert und in die oberste Reihe (A) der Deep-Wells gegeben. In Reihe B-F wurden 600 µl IMDM-Medium vorgelegt und von Reihe A beginnend 300 µl der obersten Reihe (A) in die darunter liegende pipettiert, um eine 1:3 Verdünnung zu erhalten. Dieser Vorgang wiederholte sich bis Reihe F bis sich die gewünschten Verdünnungsverhältnisse von 3:1 bis 0,01:1 ergaben (siehe Pipettierschema in Abbildung 3.1). Es folgte die Kokultivierung der T-Zellen mit den Tumorzellen durch Zugabe von jeweils 100 µl der höchsten Konzentration an T-Zellen in die oberste Reihe Tumorzellen auf der 96-Well-Platte und Fortführen des Vorgangs bis alle Verdünnungsreihen übertragen wurden. In die vorletzte Reihe wurden ausschließlich 100 µl IMDM-Medium gegeben, während die letzte Reihe frei blieb. Die Kokultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 16 Stunden.

### 3.7.4 Wash-Out Versuch

Da das Romidepsin bereits ab Nanomolarkonzentrationen zytotoxisch wirken kann, wurde ein Wash-Out Versuch durchgeführt. Hiermit sollte untersucht werden ob die T-Zellen im Rahmen der Ko-Kultivierung durch Rückstände von Romidepsin im Medium beeinflusst werden könnten. Dieser Versuch beinhaltete daher ein Verwerfen des Romidepsin-haltigen Mediums, sowie einen Waschvorgang mit 200 µl DPBS pro Well. Vor Ansetzen des Zytotoxizität-Tests mit Zugabe der T-Zellen wurden 100 µl frisches IMDM-Medium in jedes Well pipettiert.

### 3.7.5 Messung des Zytotoxizitäts-Tests

Nach 16 Stunden Kokultivierung der CAR-T-Zellen mit den Tumorzellen wurden die T-Zellen mittels 300 µl DPBS in drei Waschgängen entfernt. Nachdem alle T-Zellen abgewaschen werden konnten und nur noch adhärente Tumorzellen in den Wells verblieben waren, wurde pro Well ein Ansatz von 100 µl IMDM-Medium plus 20 µl Substrat (CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega #G3581) hinzu pipettiert. Bis zum Messzeitpunkt erfolgte eine Inkubation von 10-40 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> sowie mikroskopische Kontrollen. Gemessen wurde bei einer Absorbtionswellenlänge von 492 nm.

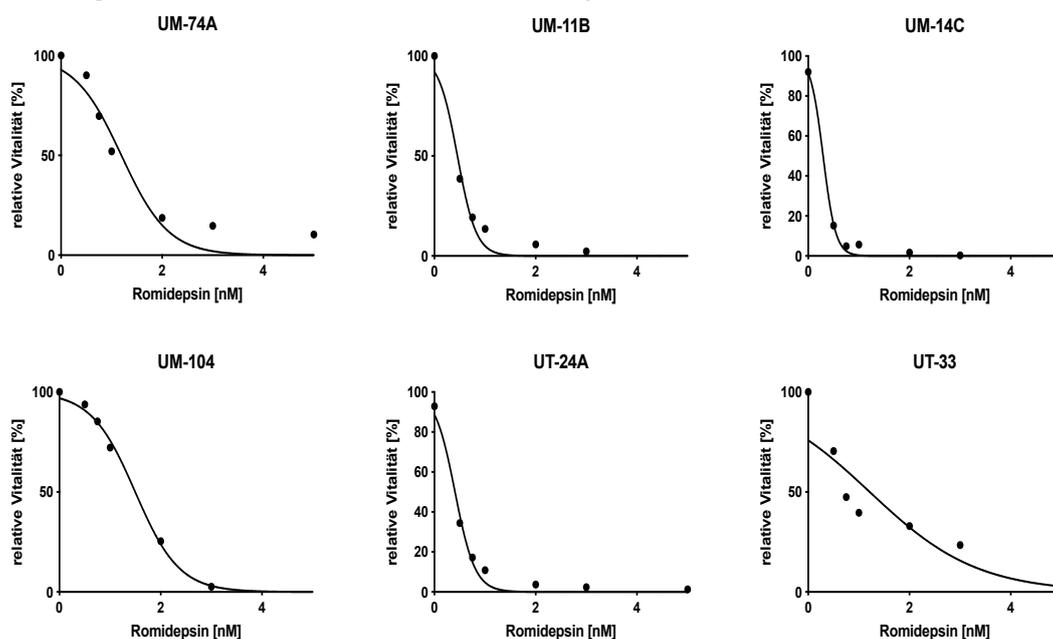
## 3.8 Statistik

Zur Bestimmung der Signifikanzen aller FACS-Analysen wurde eine *One way Anova* mit Dunnett's Korrektur für multiples Testen angewendet, um die mit Romidepsin und Decitabine behandelten Gruppen im Verhältnis zur DMSO-Kontrolle jeweils zu vergleichen. Zur Auswertung der PCR-Daten wurde ein ungepaarter T-Test durchgeführt, da es sich hier jeweils nur um den Vergleich von zwei unabhängiger Proben handelte (Romidepsin und DMSO-Kontrolle oder Decitabine und DMSO-Kontrolle). Die Signifikanzniveaus wurden einheitlich wie folgt angegeben: \*\*\* = hoch signifikant  $p < 0,001$ , \*\* = sehr signifikant  $p < 0,01$ , \* = signifikant  $p < 0,05$ .

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Effekte des HDACi Romidepsin auf die Zellproliferation von HNSCC-Zellen

Die HNSCC-Zelllinien wurden einmalig mit aufsteigenden Dosen Romidepsin sowie DMSO als Lösungsmittel behandelt. Nach 72 Stunden erfolgte die Quantifizierung der Zellvitalität mittels MTT-Assay wie in Abb. 4.1 ersichtlich.



**Abbildung 4.1:** Dosiswirkungskurve aller verwendeten HNSCC-Zelllinien 72h nach Behandlung mit Konzentrationen von 0,5 bis 5 nM Romidepsin sowie einer Negativkontrolle, die äquivalent zur höchsten Konzentration mit dem Lösungsmittel DMSO behandelt wurde. Um die Zellvitalität mittels MTT-Assay zu quantifizieren, wurde ein Mittelwert aus den jeweils vier Extinktionen pro Konzentration gebildet und auf den Mittelwert der Negativkontrolle (DMSO) normiert. Die Abszisse bildet die Wirkstoffkonzentration in nM ab, während die Ordinate die relative Vitalität in Prozent widerspiegelt. Mithilfe von Graphpad wurde eine Ausgleichskurve generiert.

Die Abbildung zeigte eine Abnahme der relativen Vitalität mit steigender Romidepsin-Konzentration über alle ausgewählten HNSCC-Zelllinien hinweg. Da eine Normierung auf die DMSO-Kontrolle (0 nM Romidepsin) erfolgte, beträgt diese 100 %. Zur höchsten Konzentration hin (5 nM Romidepsin) waren bei den allen HNSCC-Zelllinien außer UM-24A und UT-33 keine vitalen Zellen mehr vorhanden. In UM-14C, UM-104 und UT-24A waren nach 72h bereits bei 3 nM schon keine vitalen Zellen mehr vorhanden, während in UM-74A und UT-33 hier noch 20-40% der Zellen vital waren. Der Tabelle 4.1 sind die berechneten  $IC_{50}$ -Werte zu entnehmen.

**Tab. 4.1:  $IC_{50}$ -Werte aller verwendeten HNSCC-Zelllinien 72h nach Behandlung mit Romidepsin. Die  $IC_{50}$ -Werte wurden mithilfe von Graph Pad aus den in Abb. 4.1. dargestellten Ergebnissen ermittelt.**

Zelllinie	$IC_{50}$ [nM] Romidepsin 72h
UM-11B	0.39
UM-14C	0.22
UM-104	1.44
UM-74A	1.10
UT-24A	0.36
UT-33	0.84

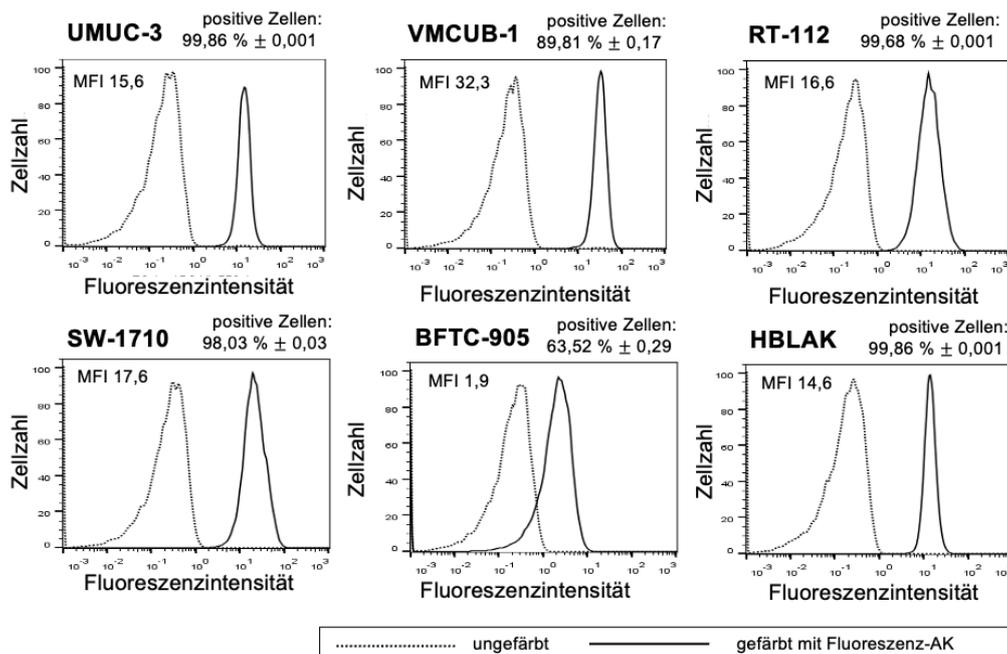
Die  $IC_{50}$ -Werte der HNSCC-Zelllinien waren bei allen Zelllinien niedriger als bei Urothelkarzinom-Zelllinien, für die in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe des urologischen Forschungslabors eine Dosis von 3 nM Romidepsin ermittelt worden war.

## **4.2 Veränderung des Immunphänotyps nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren**

### **4.2.1 Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf T-Zell-Interaktionsmoleküle**

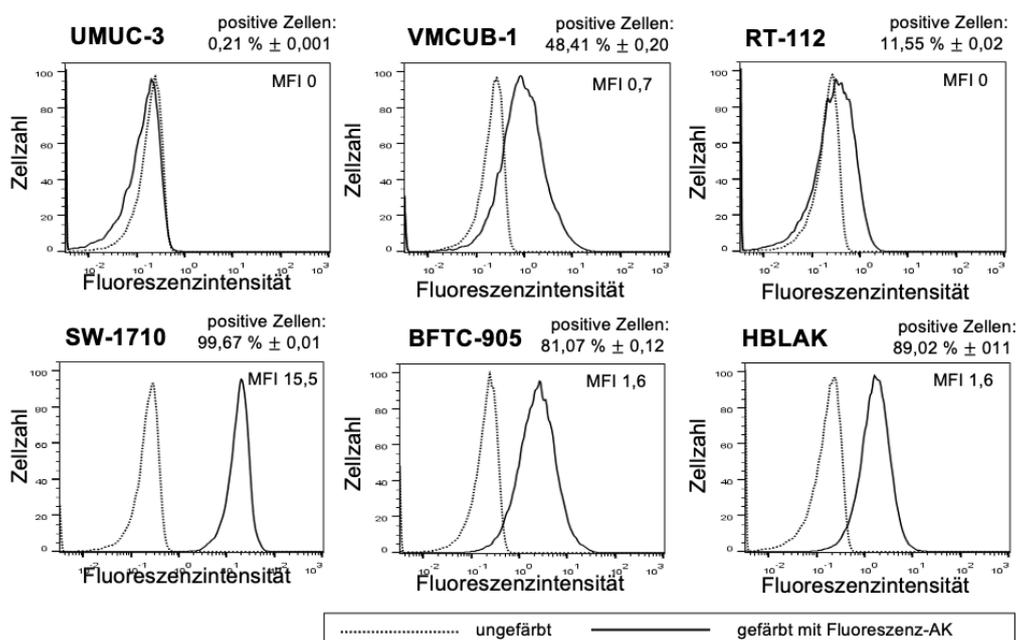
#### **4.2.1.1 Kostimulatoren**

Im Folgenden wird zunächst das basale Niveau des FAS-Rezeptors aus der Familie der Tumornekrosefaktoren und ICAM-1 als Adhäsionsmolekül und nachfolgend deren Niveau nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren aufgeführt. Diese gelten als Kostimulatoren für die Interaktion von Tumorzellen mit T-Zellen als erworbene Immunität.



**Abbildung 4.2:** Grundniveau von CD95/FAS der Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für CD95/FAS gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

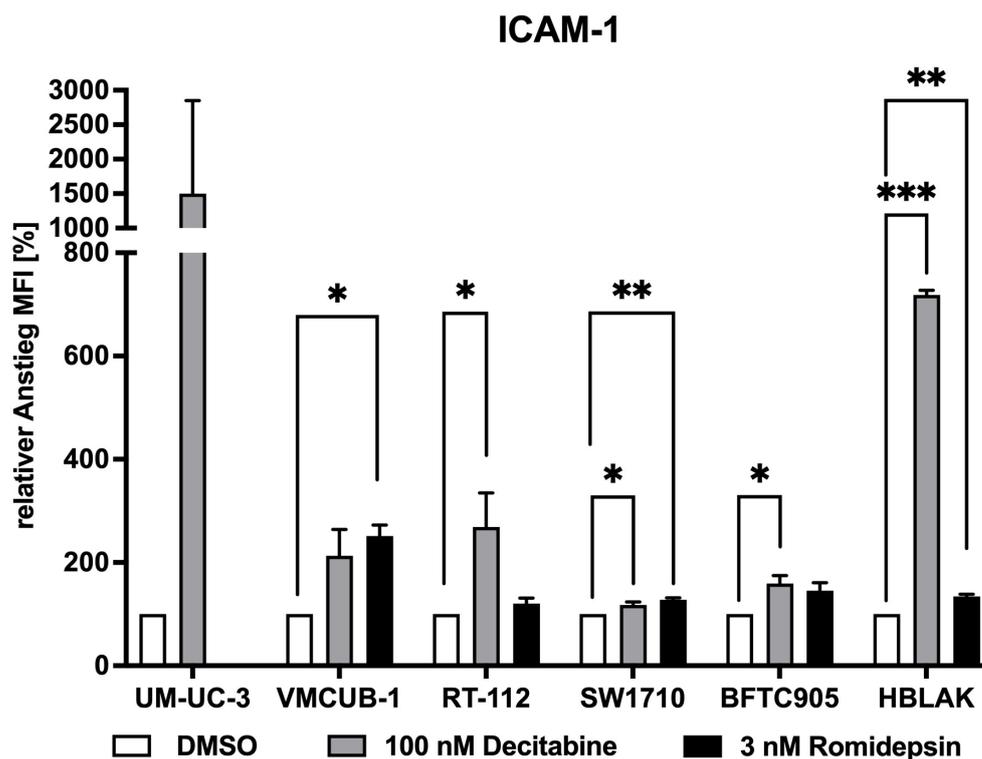
Nach Färbung mit dem Fluoreszenz-Antikörper für CD95/FAS waren in RT-112, UMUC-3, SW-1710 und der Kontrollzelllinie HBLAK über 98% der Zellen positiv für CD95/FAS, bei VMCUB-1 waren es 89,81%. Am wenigsten CD95-positive Zellen wurden bei BFTC-905 detektiert (63,52%). Insgesamt war CD95/FAS bereits auf allen Urothelkarzinom-Zelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren robust nachweisbar.



**Abbildung 4.3:** Grundniveau von ICAM-1 der Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für ICAM-1 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

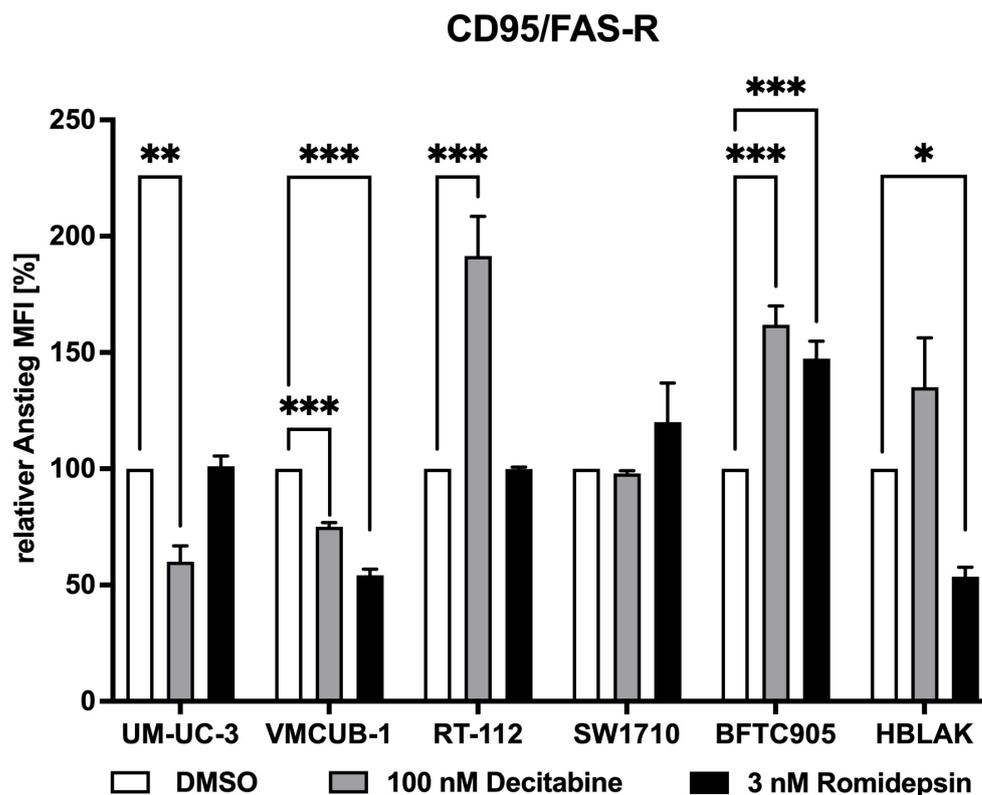
99,67% aller Zellen der Zelllinie SW-1710 waren vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren positiv für ICAM-1 auf der Oberfläche. In BFTC-905 und HBLAK waren über 80% der Zellen positiv für ICAM-1. Weniger war ICAM-1 in VMCUB-1, RT-112 und kaum in UMUC-3 vorhanden. Insgesamt war das Proteinniveau von ICAM-1 vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren eher zelllinienabhängig.

Um die Auswirkung der Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren auf das Proteinniveau von ICAM-1 und CD95/FAS zu ermitteln, wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit und ohne Behandlung durchgeführt. Die Behandlung der UC-Zelllinien erfolgte mit einmalig 3 nM Romidepsin (HDACi) über 72h oder dreitägig mit 100 nM Decitabine (DNMTi) über einen Zeitraum von sieben Tagen bis zur Messung, da diese Wirkstoffkonzentrationen in Vorversuchen von C. M. Grunewald (urologisches Forschungslabor) am effektivsten waren.



**Abbildung 4.4:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von ICAM-1 in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Für ICAM-1 fiel nach Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Decitabine insbesondere ein starker Anstieg des Proteinniveaus in der Urothelkarzinomzelllinie UM-UC-3 auf. Bei der Kontrollzelllinie HBLAK war ein hoch signifikanter Anstieg nach Decitabine-Behandlung erkenntlich. In RT-112 und VMCUB-1 zeigte sich nach Decitabine-Behandlung ebenfalls eine Verstärkung, in BFTC-905, SW-1710 und UMUC-3 zeigte sich kein stark ausgeprägter Effekt. Nach Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Romidepsin war das Proteinniveau für ICAM-1 hauptsächlich in VMCUB-1 signifikant erhöht. Die übrigen abgebildeten Zelllinien verzeichneten keinen relevanten Anstieg des Proteinniveaus nach Decitabine-Behandlung. Insgesamt zeigte sich hauptsächlich nach Decitabine-Behandlung ein gesteigertes Niveau von ICAM-1 in den Zelllinien UM-UC-3 und HBLAK.



**Abbildung 4.5:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von CD95/FAS in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Der FAS-Rezeptor (CD95) wurde nach Decitabine-Behandlung hoch signifikant am stärksten in RT-112 exprimiert. Ansonsten zeigte sich nach Behandlung mit dem DNMTi eine Induktion von FAS-R in BFTC-905 und HBLAK. In UM-UC-3 und VMCUB-1 zeigte sich nach Behandlung mit beiden epigenetischen Inhibitoren sogar teilweise eine Reduktion von CD95. Die Behandlung mit Romidepsin wirkte sich am ehesten auf die Zelllinie BFTC-905 aus.

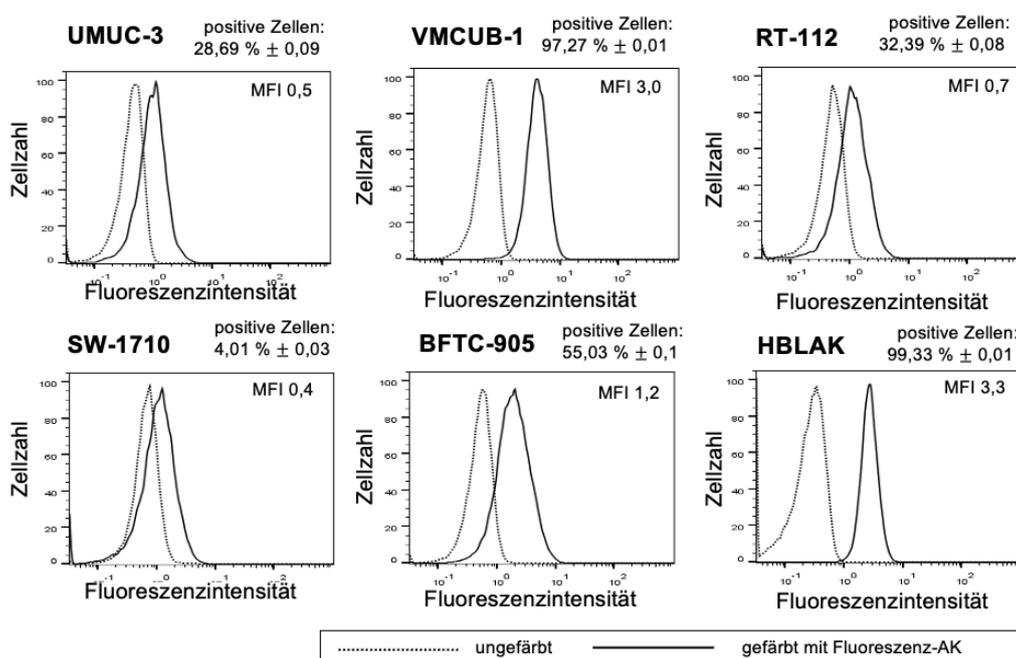
Insgesamt konnte die Behandlung mit dem HDACi (Romidepsin) das Proteinniveau von FAS-R auf der Zelloberfläche der UC-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK weniger steigern als die Behandlung mit dem DNMTi. Nach Decitabine-Behandlung zeigte sich der größte hoch signifikante Effekt in der Zelllinie RT-112.

Zusammenfassend fiel ein zelllinien-abhängiges Proteinniveau von ICAM-1 und FAS-Rezeptor auf, welche nach Behandlung mit den beiden epigenetischen Inhibitoren bis auf das Doppelte gesteigert werden konnte. Eine besonders starke Induktion für ICAM-1 war nach Behandlung mit Decitabine in den Zelllinien UMUC-3 und HBLAK auffällig.

#### 4.2.1.2 Koinhibitoren

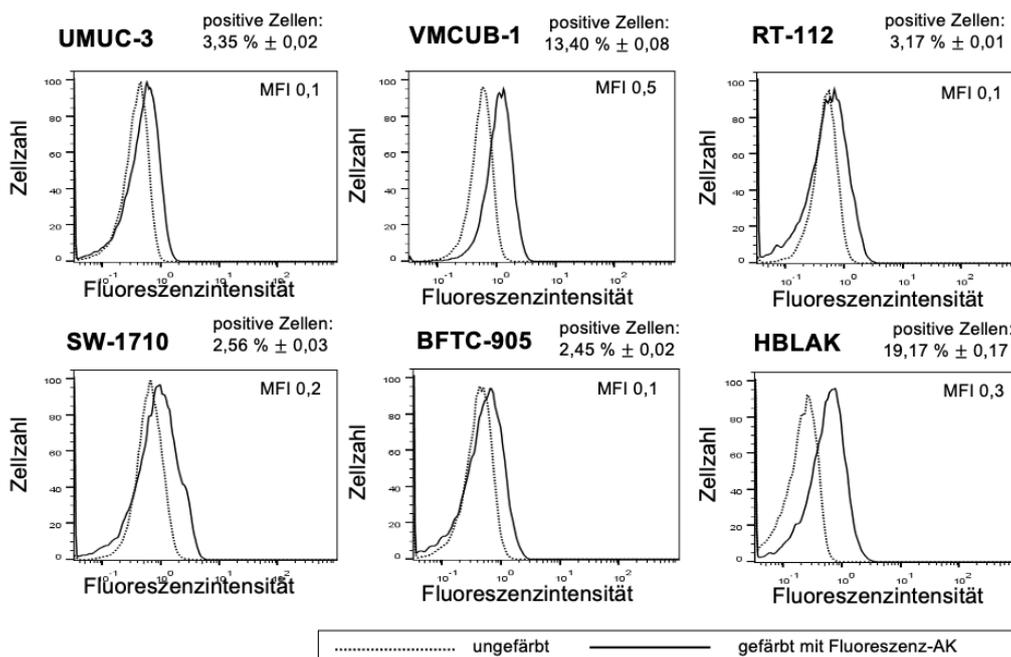
PD-L1 und PD-L2 werden als Koinhibitoren für die Interaktion von Tumorzellen mit T-Zellen gezählt, da sie eine Immunreaktion bremsen. Dies dient physiologischerweise dazu, eine überschießende Immunantwort zu vermeiden. Tumoren können sich diesen Mechanismus jedoch ebenso zunutze machen.

Die folgende Abbildung stellt das basale Niveau der Koinhibitoren unbehandelte Zellen dar.



**Abbildung 4.6:** Grundniveau von PD-L1 der Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für PD-L1 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

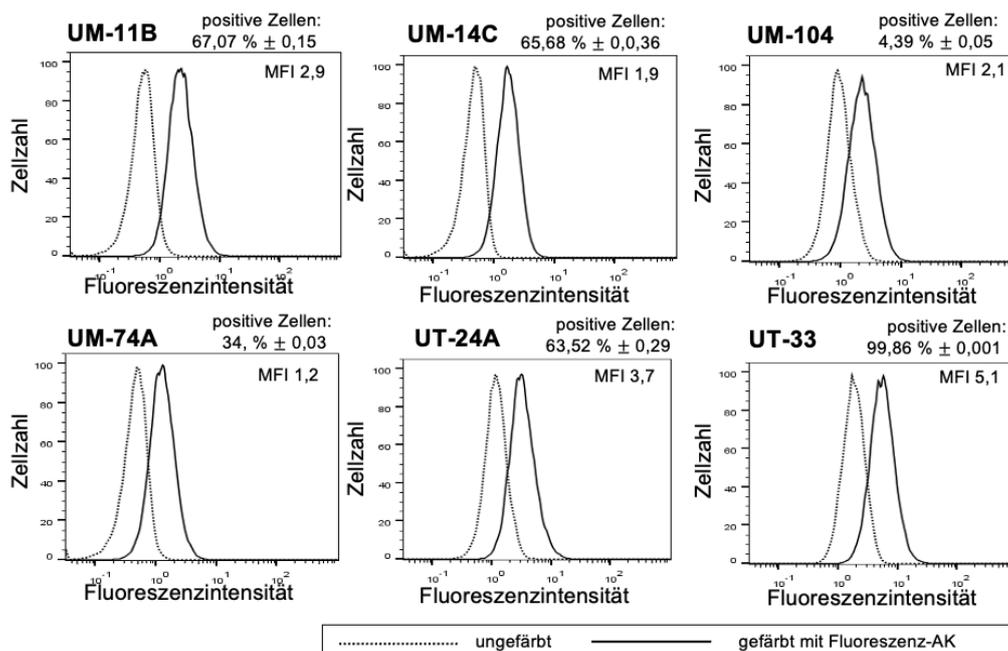
Über 97% der Zellen in VMCUB-1 und HBLAK präsentierten PD-L1 nach Antikörper-Färbung auf der Zelloberfläche. Eine besonders geringes Grundniveau von PD-L1 fiel in SW1710 auf.



**Abbildung 4.7:** Grundniveau von PD-L2 der Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für PD-L2 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

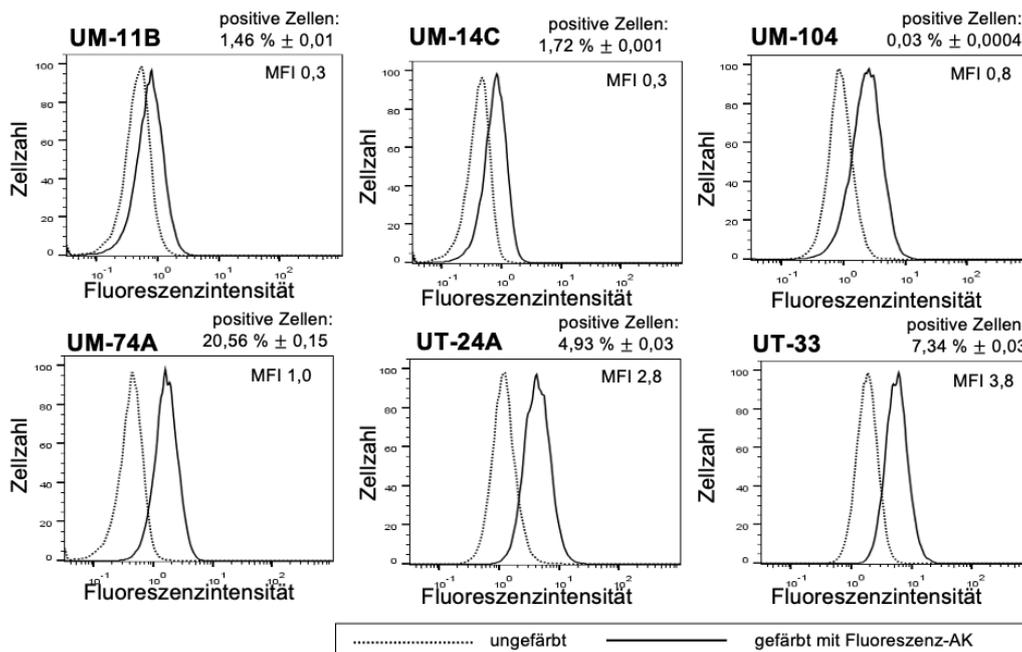
Über alle dargestellten Zelllinien hinweg waren weniger als 20% aller unbehandelten Zellen positiv für PD-L2 nach Antikörper-Färbung.

Letztendlich war PD-L1 vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren bereits vermehrt auf der Oberfläche von Urothelkarzinomzelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK detektierbar, während dies für PD-L2 nicht der Fall war.



**Abbildung 4.8: Grundniveau von PD-L1 der HNSCC-Zelllinien nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für PD-L1 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.**

Über 65% der vitalen Zellen in UM-11B und UM-14C wiesen PD-L1 nach Antikörperfärbung auf. UM-74A, UT-24A und UT-33 zeigten circa 30% PD-L1 positive Zellen. Bei UM-104 waren nur 5% PD-L1 positiv.

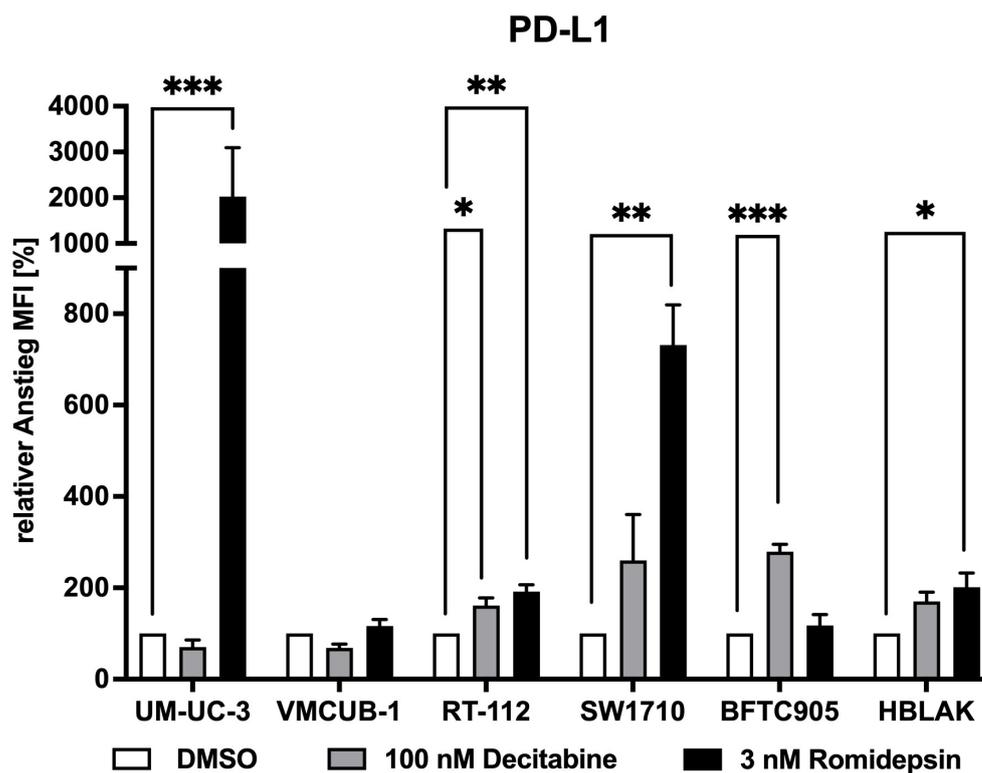


**Abbildung 4.9: Grundniveau von PD-L2 der HNSCC-Zelllinien nach Antikörper-Färbung.** Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für PD-L2 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

Die HNSCC-Zelllinie UM-74A präsentierte mit 20% am meisten PD-L2 auf der Oberfläche von allen dargestellten HNSCC-Zelllinien. In den übrigen Zelllinien betrug das Grundniveau von PD-L2 weniger als 10%.

Es zeigte sich also sowohl in den UC- als auch in den HNSCC-Zelllinien ein insgesamt stärkeres Grundniveau von PD-L1 und ein vergleichsweise extrem niedriges Grundniveau von PD-L2 in den unbehandelten Zelllinien.

Im Folgenden wird die durchflusszytometrisch ermittelte Proteinabundanz der beiden Koinhibitoren nach Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren Romidepsin und Decitabine sowohl in den Urothelkarzinom- als auch in den HNSCC-Zelllinien dargestellt.

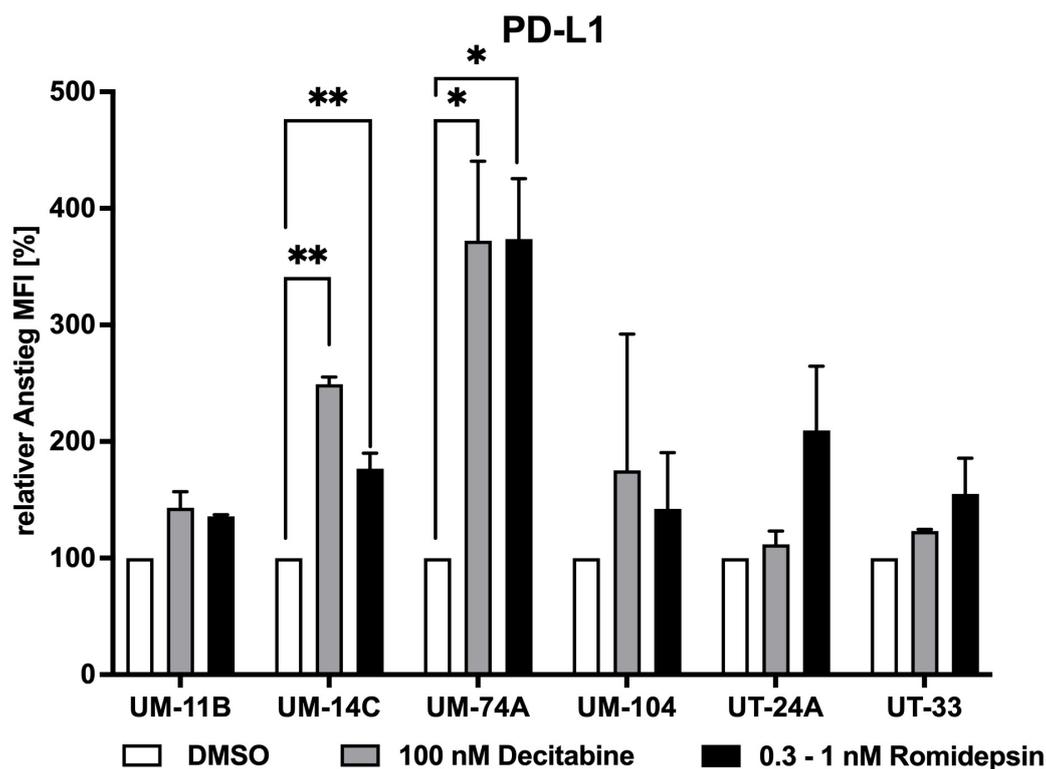


**Abbildung 4.10:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von PD-L1 in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Nach Behandlung mit Decitabine zeigte sich in den Zelllinien RT-112, SW1710, BFTC-905 und HBLAK eine Induktion von PD-L1. In UM-UC-3 und VMCUB-1 war kein Anstieg zu verzeichnen.

Die größte Auswirkung auf die Proteinabundanz von PD-L1 hatte die Romidepsin-Behandlung in den Urothelkarzinom-Zelllinien UMUC-3 mit einer hoch signifikanten 20-fachen Verstärkung und SW1710 mit 7-facher Verstärkung. HBLAK und RT-112 präsentierte nach Behandlung mit Romidepsin doppelt so viel PD-L1 auf der Oberfläche. Keine signifikanten Effekte der Romidepsin-Behandlung in Bezug auf PD-L1 zeigten VMCUB-1 und BFTC-905.

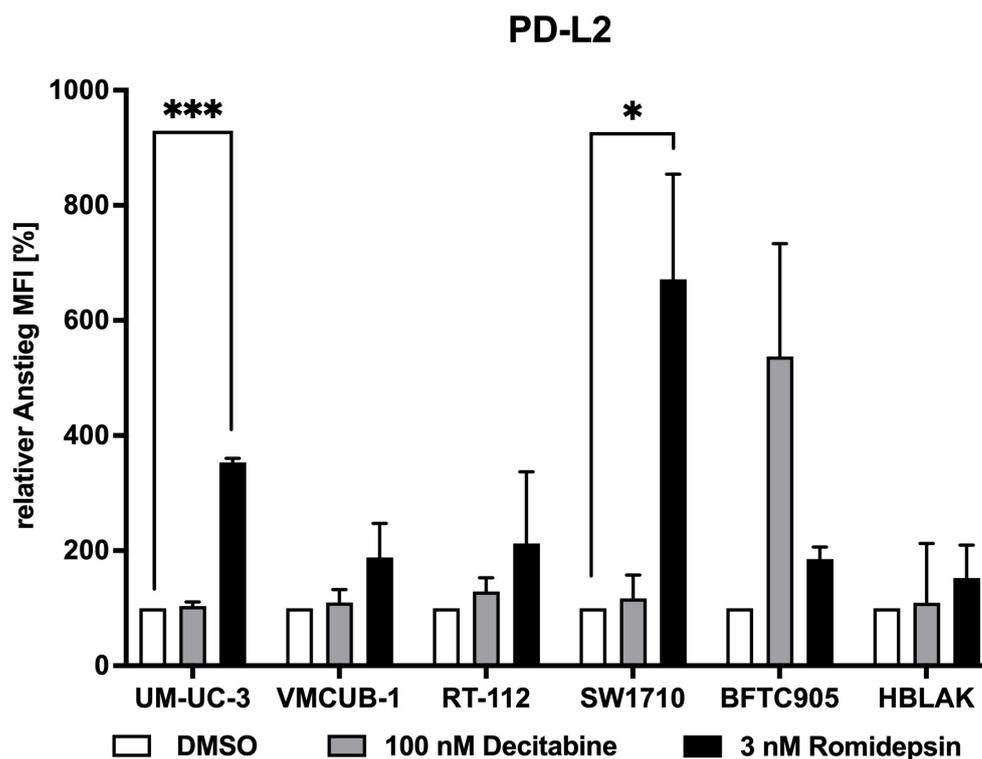
Insbesondere fiel die hoch signifikante Steigerung von PD-L1 in der Zelllinie UM-UC-3 nach Behandlung mit Romidepsin auf. Insgesamt wurde das Proteinniveau auf den Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK überwiegend durch Romidepsin erhöht, Decitabine wies zelllinien-abhängig eine Induktion auf.



**Abbildung 4.11: FACS-Analyse des Proteinniveaus von PD-L1 in HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren.** Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

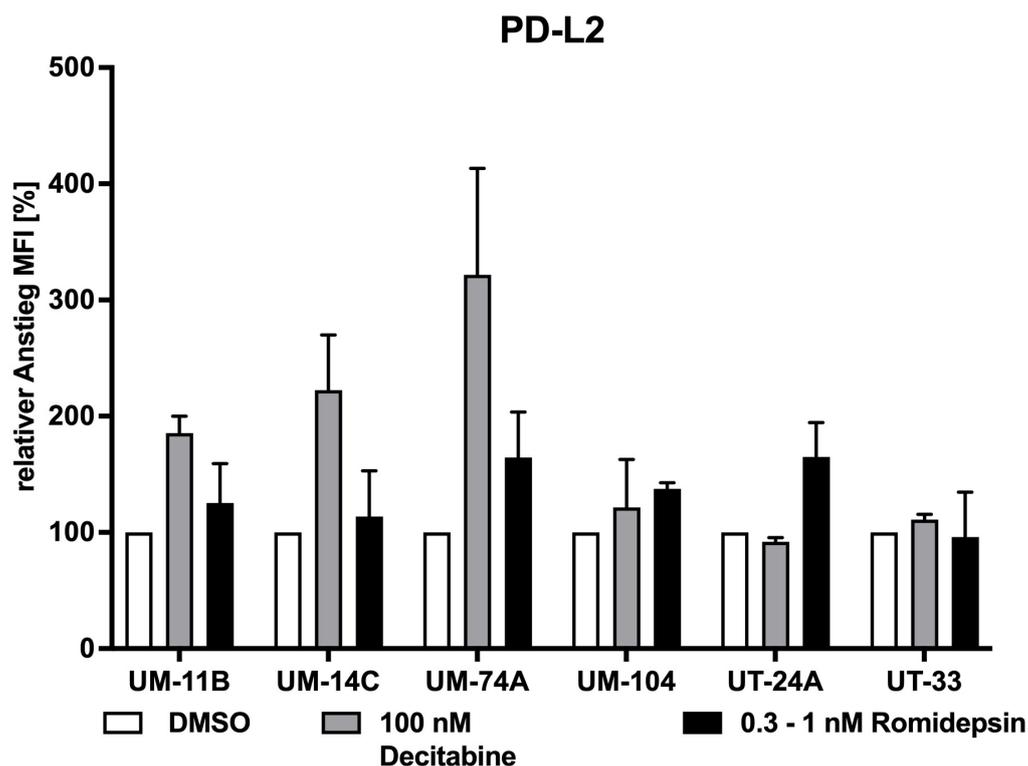
In den HNSCC-Zelllinien zeigte sich insgesamt ein vergleichbarer Effekt der beiden epigenetischen Inhibitoren auf PD-L1. Besonders fiel die Zelllinie UM-74A auf, die sowohl nach Decitabine- als auch nach Romidepsin-Behandlung eine signifikant Steigerung für PD-L1 auf über das 3-fache aufwies. Des Weiteren zeigte sich in UM-14C nach Decitabine-Behandlung ein Anstieg der PD-L1-Expression auf mehr als das Doppelte. Auch in UM-104 und in UM-11B konnte PD-L1 nach Decitabine-Behandlung gesteigert werden. Nach Romidepsin-Behandlung zeigte sich in UT-24A ein Anstieg von PD-L1 auf das Doppelte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. PD-L1 wurde nach Romidepsin-Behandlung in UM-14C, in UT-33, in UM-104 und in UM-11B nur leicht gesteigert.

Insgesamt führte sowohl die Behandlung mit Romidepsin als auch mit Decitabine zu einer Induktion von PD-L1 in allen aufgeführten HNSCC-Zelllinien.



**Abbildung 4.12:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von PD-L2 in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Für PD-L2 zeigte sich nach Behandlung mit Romidepsin in SW1710 ein signifikanter Anstieg der Proteinabundanz, welcher sich deutlich von den anderen Balken abhebt. Weiterhin war PD-L2 nach Romidepsin-Behandlung in UMUC-3 dreifach und in VMCUB-1 fast 2,5-fach und in BFTC-905 doppelt so stark erhöht. Nach Behandlung mit dem DNMTi Decitabine zeigte sich ein Anstieg von PD-L2 auf mehr als das Dreifache in BFTC-905. In den übrigen aufgeführten UC-Zelllinien fielen keine signifikanten Effekte nach Behandlung mit Decitabine auf. Insgesamt bewirkte die Behandlung mit Romidepsin einen Anstieg von PD-L2 in allen abgebildeten Zelllinien, während sich nach Decitabine-Behandlung ausschließlich eine hoch signifikante Steigerung in der Zelllinie BFTC-905 darstellte.



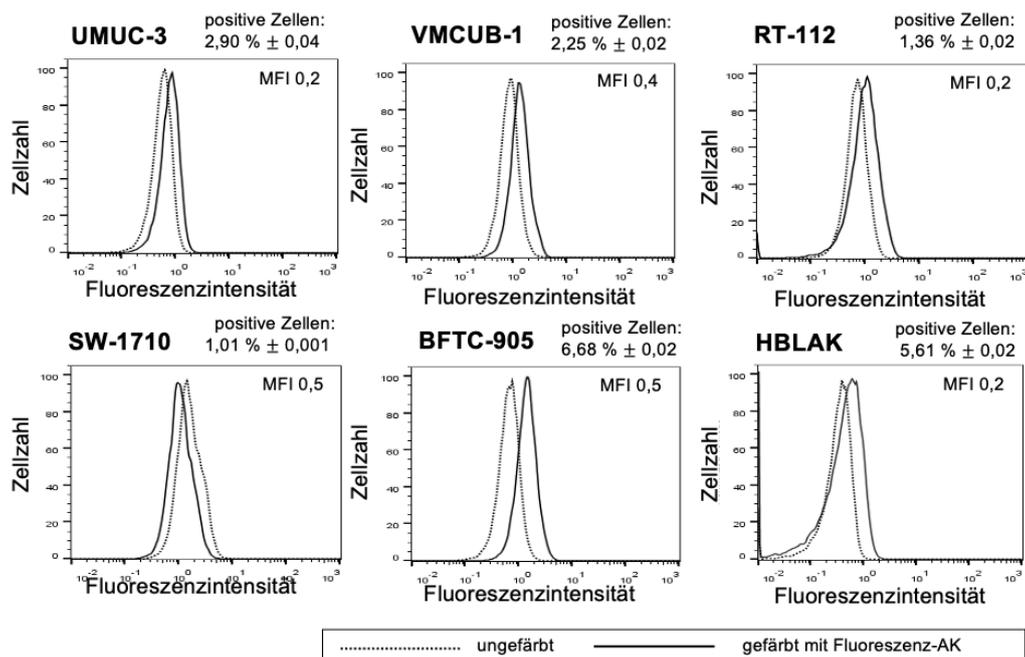
**Abbildung 4.13:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von PD-L2 in HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Für PD-L2 gab es für die HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit Romidepsin als auch Decitabine keine signifikanten Unterschiede.

Letztendlich wurden PD-L1 und PD-L2 in den UC-Zelllinien vorwiegend durch Romidepsin induziert, besonders stark in UMUC-3 und SW1710. Die Expression von PD-L1 und PD-L2 war in den HNSCC eher zelllinien-abhängig induziert, besonders in UM-74A.

#### 4.2.2 Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf NK-Zell-Interaktionsmolekülen

Als NK-Zell-Aktionsmoleküle wird im Folgenden ULBP-3 untersucht. Das Proteinniveau vor und nach Behandlung mit Romidepsin und Decitabine wird im Folgenden dargelegt.

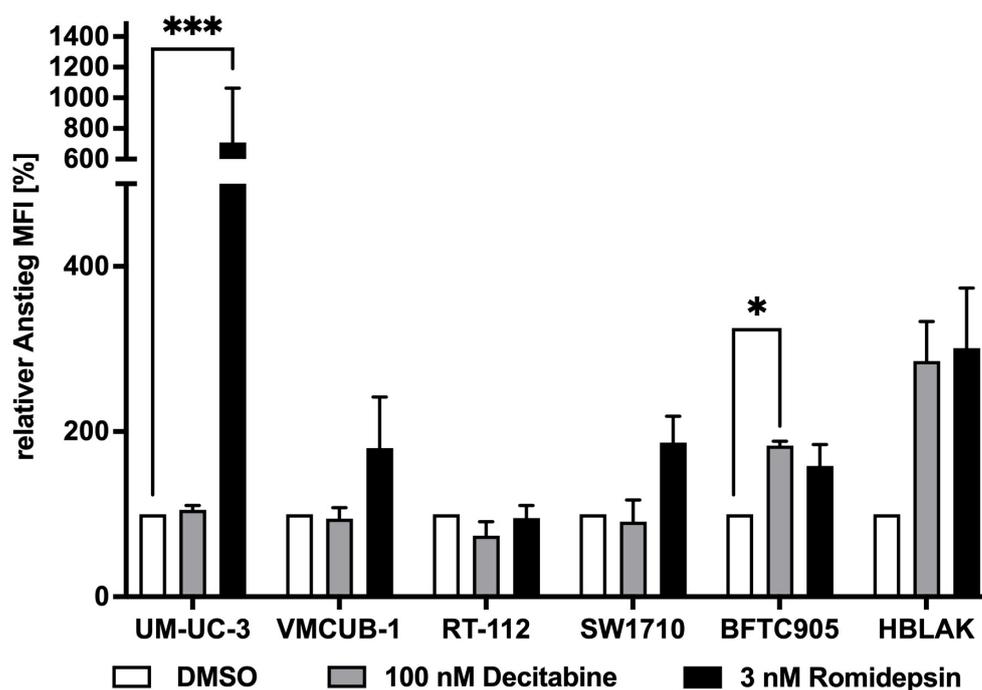


**Abbildung 4.14:** Grundniveau von ULBP-3 der Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für ULBP-3 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

Vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren konnten über alle dargestellten Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK weniger als 10% positive Zellen für ULBP-3 nachgewiesen werden, was für ein eher geringes Proteinniveau spricht.

Wie sich die Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren auf ULBP-3 auswirkt, wird im Folgenden dargelegt:

## ULBP3



**Abbildung 4.15:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von ULBP-3 in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Für ULBP-3 sah man insbesondere eine hoch signifikante Steigerung auf das 3,5-Fache in UM-UC-3 nach Romidepsin-Behandlung. Auch in den Zelllinien HBLAK, VMCUB-1, SW1710 und BFTC-905 war nach Behandlung mit dem HDACi eine Steigerung von ULBP-3 erkennbar. In RT-112 zeigte sich kein Effekt durch die Behandlung mit Romidepsin und Decitabine.

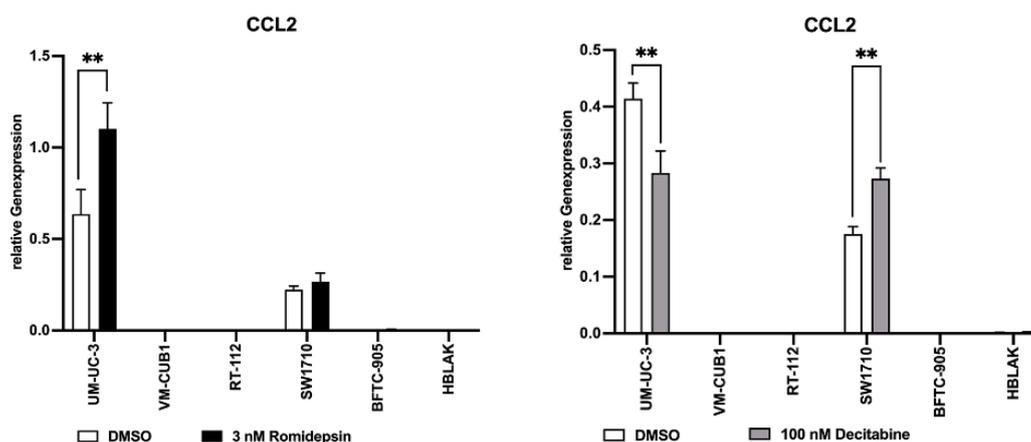
Die Behandlung mit dem DNMTi Decitabine wirkte sich mit einer Steigerung von ULBP-3 in den Zelllinien HBLAK und BFTC-905 aus. Die anderen abgebildeten Zelllinien wiesen Veränderung nach Decitabine-Behandlung auf.

Insgesamt ist die Induktion des NK-Zell-Interaktionsmoleküls ULBP-3 durch epigenetische Inhibitoren eher Zelllinien-abhängig und wird nach Romidepsin insbesondere von der Zelllinie UM-UC-3 hoch signifikant induziert und nach Decitabine-Behandlung vermehrt in den Zelllinien BFTC-905 und HBLAK.

### 4.2.3 Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf die Expression von Chemokinen

Um eine Veränderung der Chemokin-Expression von Tumorzellen und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren zu analysieren, wurde die relative Genexpression mittels quantitativer Echtzeit-PCR ermittelt und im Folgenden dargestellt.

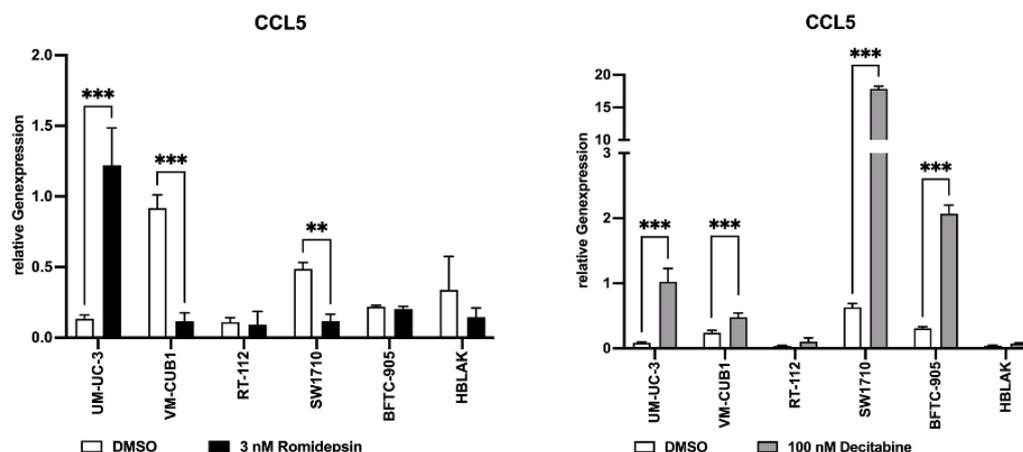
Die Chemokine *CXCL10*, *CCL2* und *CCL5* sind durch das Erreichen einer höheren T-Zell-dichte in bestimmten Tumorregionen in Studien mit einem besseren Überleben assoziiert. [38] Zudem werden über die *CXCL9*, *-10*, *-11/CXCR3*-Achse Immunzellen wie zytotoxische T-Lymphozyten rekrutiert, was u.a. zu einem verbesserten Ansprechen auf Checkpointinhibitoren führen kann. [36] Aus diesem Grunde werden die Auswirkung einer Behandlung von Tumorzellen mit epigenetischen Inhibitoren auf die Expression der Chemokine *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10* sowie *CXCL11* näher betrachtet.



**Abbildung 4.16: Relative Genexpression von CCL2/TBP in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO (weiße Balken) wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.**

Betrachtet man zunächst die mit dem Lösungsmittel DMSO behandelte Kontrolle, so fällt auf, dass das Chemokin *CCL2* in UMUC-3 und SW1710 Zellen im Vergleich zu den anderen dargestellten Zelllinien bereits vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren vermehrt exprimiert wurde. In UMUC-3 stieg die relative Genexpression nach Behandlung mit Romidepsin sehr signifikant an, während in SW1710 nur ein minimaler Anstieg nach Behandlung mit Romidepsin und Decitabine zu verzeichnen war. Nach Decitabine-Behandlung zeigte sich in SW1710 eine sehr signifikante Erhöhung, in den sonstigen UC-Zelllinien hinweg fiel sonst

keine signifikante Zunahme der Expression von *CCL2* auf, in UMUC-3 war sogar eine Abnahme zu verzeichnen. In VM-CUB-1, RT-112, BFTC-905 und HBLAK wurde *CCL2* verhältnismäßig wenig stark exprimiert.

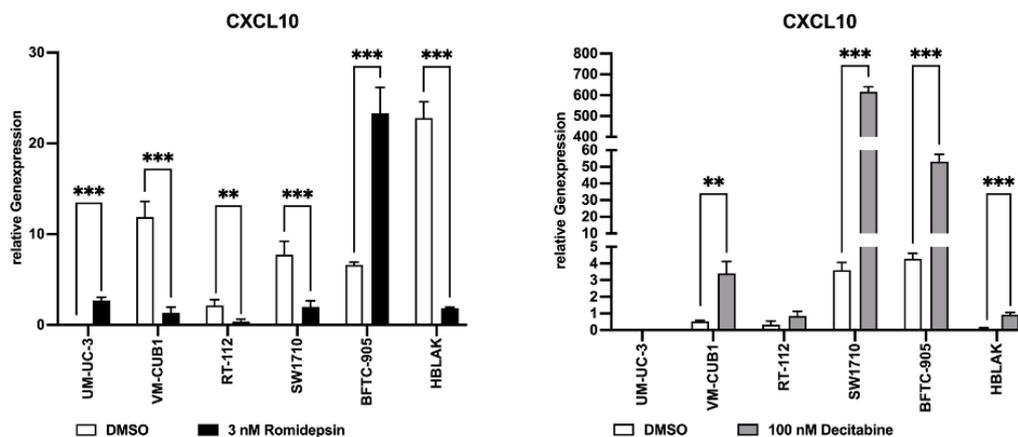


**Abbildung 4.17: Relative Genexpression von *CCL5/TBP* in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.**

Vor Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren zeigte sich in den UC-Zelllinien VM-CUB1 und SW1710 bereits eine höhere Grundexpression nach drei Tagen als nach Behandlung mit Romidepsin. Die Genexpression von *CCL5* konnte durch Behandlung mit dem HDACi Romidepsin ausschließlich hoch signifikant in der UC-Zelllinie UM-UC-3 auf mehr als das 9-Fache gesteigert werden. In den übrigen aufgeführten Zelllinien zeigte sich die Expression von *CCL5* nach Behandlung mit Romidepsin eher vermindert.

Beim Vergleich der relativen Genexpression nach Behandlung fiel in der Urothelkarzinom-Zelllinie SW1710 ein hochsignifikanter Anstieg von *CCL5* nach Decitabine-Behandlung auf das 28-Fache der unbehandelten Lösungsmittelkontrolle auf. Ein Anstieg auf das 6,8-Fache in BFTC-905 fand sich ebenfalls nach Decitabine-Behandlung.

Grundsätzlich konnte die Behandlung mit Decitabine die Genexpression von *CCL5* im Vergleich zur Expression der Lösungsmittelkontrolle über fast alle Zelllinien hinweg steigern, während dies nach Behandlung mit Romidepsin ausschließlich in UM-UC-3 der Fall war.



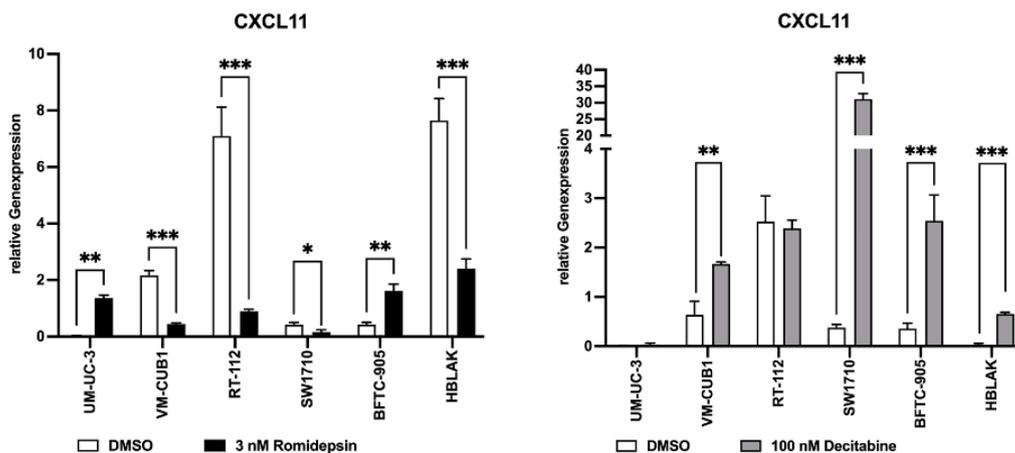
**Abbildung 4.18: Relative Genexpression von CXCL10/TBP in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren.** Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Eine hohe Grundexpression von CXCL10 fiel in der Lösungsmittelkontrolle nach drei Tagen in VM-CUB1, SW1710, BFTC-905 und am stärksten in der Zelllinie HBLAK auf, während sich dieser Effekt nach sieben Tagen ausschließlich in SW1710 und BFTC-905 darstellte.

Nach Behandlung mit Romidepsin zeigte sich ein hochsignifikanter Anstieg der Genexpression von CXCL10 in BFTC-905 auf das 3,5-fache. Hier konnte die Expression durch die HDACi Behandlung auf mehr als das Dreifache gesteigert werden. In den übrigen dargestellten Zelllinien wurde kein relevanter Anstieg nach Behandlung mit Romidepsin verzeichnet.

Ebenso wie für CCL5 zeigte sich für CXCL10 der stärkste Effekt nach Decitabine-Behandlung in SW1710. Die relative Genexpression war hier 170-fach erhöht. Dieser Effekt war verglichen mit den Auswirkungen der Behandlung mit Romidepsin hochsignifikant und hob sich von den anderen Zelllinien deutlich ab. In der Zelllinie BFTC-905 war ein Anstieg der relativen Genexpression für CXCL10 auf mehr als das 10-fache nach Decitabine zu verzeichnen.

Insgesamt zeigte sich nach Decitabine-Behandlung ein hochsignifikanter Anstieg der relativen Genexpression für CXCL10 in den Zelllinien SW1710 und BFTC-905, während sich nach Behandlung mit Romidepsin ausschließlich in der UC-Zelllinie BFTC-905 ein hochsignifikanter Anstieg der Expression darlegte. In VM-CUB-1, RT-112, SW1710 und der Kontrollzelllinie HBLAK war die Expression von CXCL10 nach Romidepsin-Behandlung teilweise auf bis zu ein Zehntel der Expression in der DMSO-Kontrolle gesunken.



**Abbildung 4.19: Relative Genexpression von CXCL11/TBP in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.**

Für das Chemokin CXCL11 wiesen die Zelllinien HBLAK und RT-112 ohne Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren nach 72h eine erhöhte Genexpression auf. Nach Behandlung mit Romidepsin zeigte sich ausschließlich in den Zelllinien UM-UC-3 und BFTC-905 eine sehr signifikant vermehrte Expression von CXCL11. In RT-112, VMCUB-1, SW1710 und HBLAK war nach Behandlung mit dem HDACi die Chemokinexpression von CXCL11 vermindert.

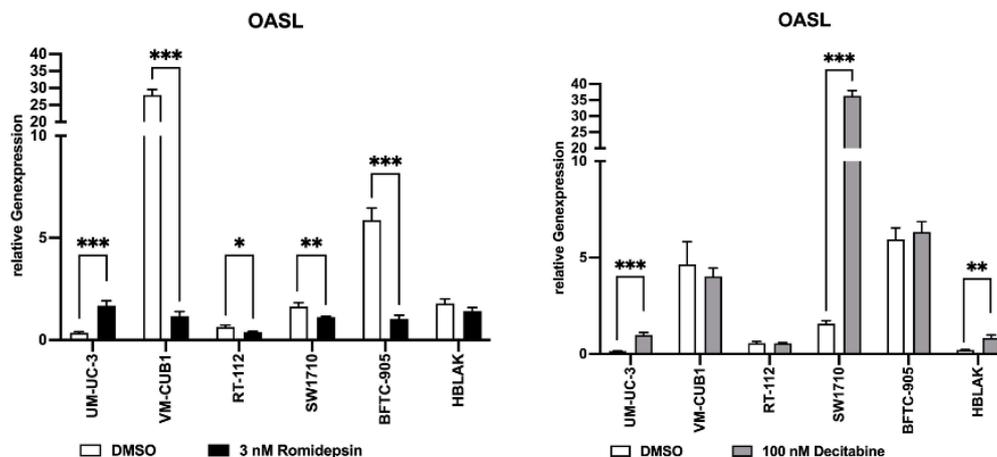
Ein hochsignifikanter Anstieg der Expression von CXCL11 über das 80-Fache nach Decitabine-Behandlung fiel in der UC-Zelllinie SW1710 auf. In BFTC-905 war ein hochsignifikanter, siebenfach erhöhte Expression ersichtlich. Auch in VMCUB-1 und HBLAK konnte die relative Genexpression von CXCL11 durch die Decitabine-Behandlung gesteigert werden.

Insgesamt fiel auf, dass die Chemokin-Expression durch Decitabine-Behandlung eher anstieg (besonders in SW1710) oder sich nicht signifikant veränderte, während die Romidepsin-Behandlung in einigen Zelllinien zu einer verminderten Expression der o.g. Chemokine führte.

#### 4.2.4 Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf die Expression von Surrogatmarkern des Viral Mimicry Signalwegs

OASL, IFI44 und STAT1 sind Surrogatmarker für den Viral Mimicry Signalweg, da sie am Ende der Signalkaskade von Bedeutung sind. Daher lässt sich bei einer vermehrten Genexpression von OASL, IFI44 und STAT1 nach Behandlung darauf schließen, dass diese Signalkaskade aktiviert wurde. Es werden hier die Ergebnisse der relativen Genexpression der genannten Surrogatmarker nach

Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren in den Urothelkarzinom-Zelllinien dargestellt.

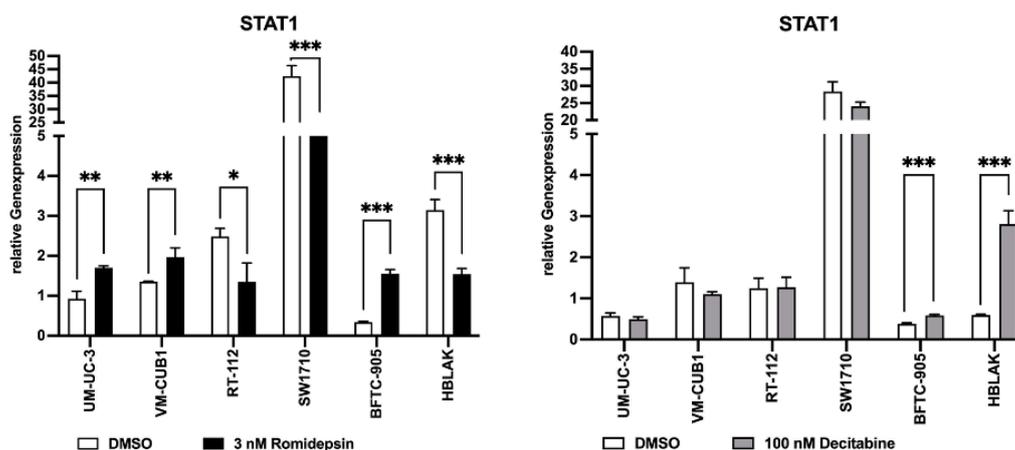


**Abbildung 4.20: Relative Genexpression von OASL in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.**

Unbehandelt wies die Zelllinie VM-CUB1 eine besonders stark ausgeprägte Genexpression von OASL nach 72 h auf. Auch in BFTC-905 fiel eine starke Expression von OASL nach 72h ohne Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren auf. Durch die Behandlung mit Romidepsin konnte die relative Genexpression von OASL ausschließlich in der Zelllinie UM-UC-3 auf über das 4-fache gesteigert werden.

Nach Behandlung mit Decitabine zeigte sich hauptsächlich in der UC-Zelllinie SW1710 ein hochsignifikanter Anstieg der Expression von OASL um das 20-fache.

Insgesamt wirkte sich die Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren auf vereinzelte Zelllinien aus. Die Romidepsin-Behandlung konnte eine vermehrte Expression in der UC-Zelllinie UM-UC-3 und die Decitabine Behandlung in SW1710 hervorrufen.

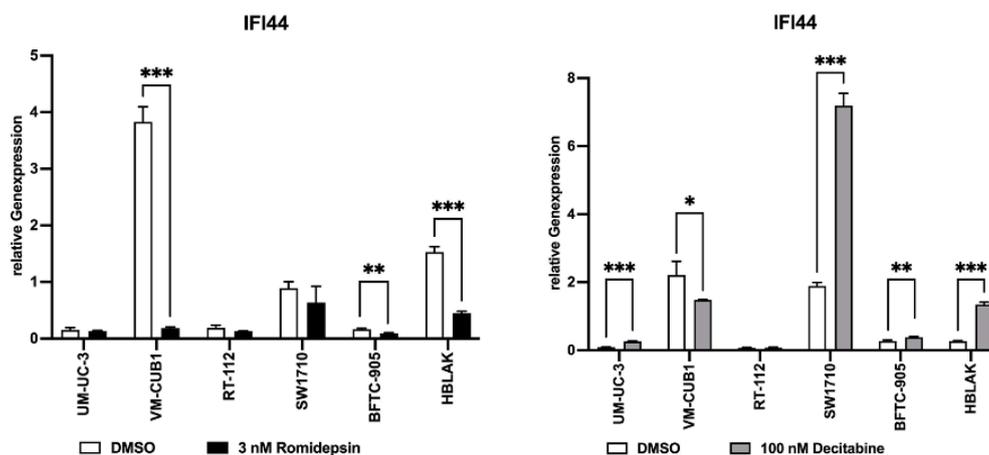


**Abbildung 4.21: Relative Genexpression von STAT1/TBP in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.**

Unbehandelt fiel in der UC-Zelllinie SW1710 sowohl nach 72h als auch nach 7 Tagen eine starke Expression von STAT1 auf. Auch in der Kontrollzelllinie HBLAK war die Expression von STAT1 hoch.

Nach Romidepsin-Behandlung konnte in den UC-Zelllinien UM-UC-3, VM-CUB1 und vor allem in BFTC-905 (4,6-fach erhöht) eine vermehrte Genexpression von STAT1 nachgewiesen werden, während die Decitabine-Behandlung einen hoch signifikanten Anstieg der Genexpression von STAT1 auf das 4,7-Fache in der Kontrollzelllinie HBLAK bewirkte.

Insgesamt zeigte sich für SW1710 die höchste Genexpression von STAT1 bereits vor Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren, welche durch eine Behandlung nicht gesteigert werden konnte.



**Abbildung 4.22: Relative Genexpression von IFI44/TBP in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren.** Zur Bestimmung der relativen Genexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde die Genexpression mittels qPCR am siebten Tag gemessen. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Im Vergleich zu den anderen aufgeführten Zelllinien, war die relative Genexpression von *IFI44* vor Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren besonders in VMCUB-1, aber auch in SW1710 und HBLAK hoch.

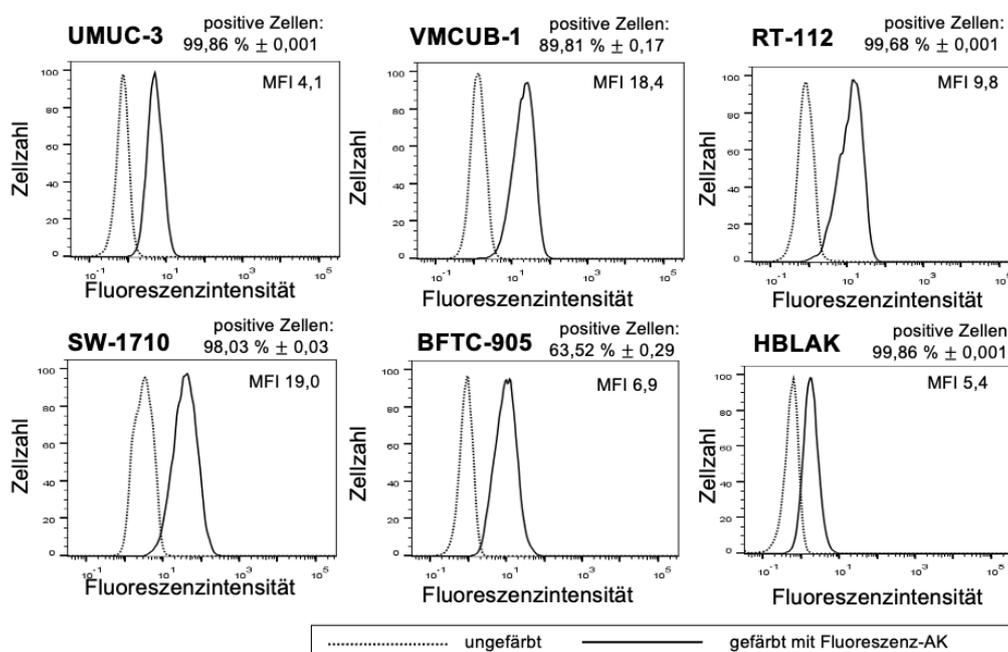
Nach Behandlung mit Romidepsin zeigte sich über alle Zelllinien hinweg eher eine verminderte Genexpression für *IFI44*, während dies nach Decitabine-Behandlung nur für VMCUB-1 und RT-112 der Fall war. Es zeigte sich ein hochsignifikanter 5-facher Anstieg der Genexpression in der uroepithelialen Zelllinie HBLAK nach Decitabine-Behandlung. Außerdem war die Expression von *IFI44* in SW1710 hochsignifikant erhöht und wies insgesamt die stärkste relative Genexpression von *IFI44* nach Behandlung auf.

Zusammenfassend fiel in SW170 eine ausgeprägte und hoch signifikante Steigerung der Genexpression von *OASL* und *IFI44* nach Behandlung mit Decitabine auf, während die UC-Zelllinie VMCUB-1 diese beiden Viral Mimicry Surrogatmarker bereits vor Behandlung stärker exprimierte als die anderen aufgeführten Zelllinien. Insgesamt zeigte sich für alle drei Marker vorwiegend eine vermehrte Induktion durch Decitabine-Behandlung und weniger durch Romidepsin.

## 4.3 Zytotoxizitäts-Test nach Koinkubation von T-Zellen mit Tumorzellen

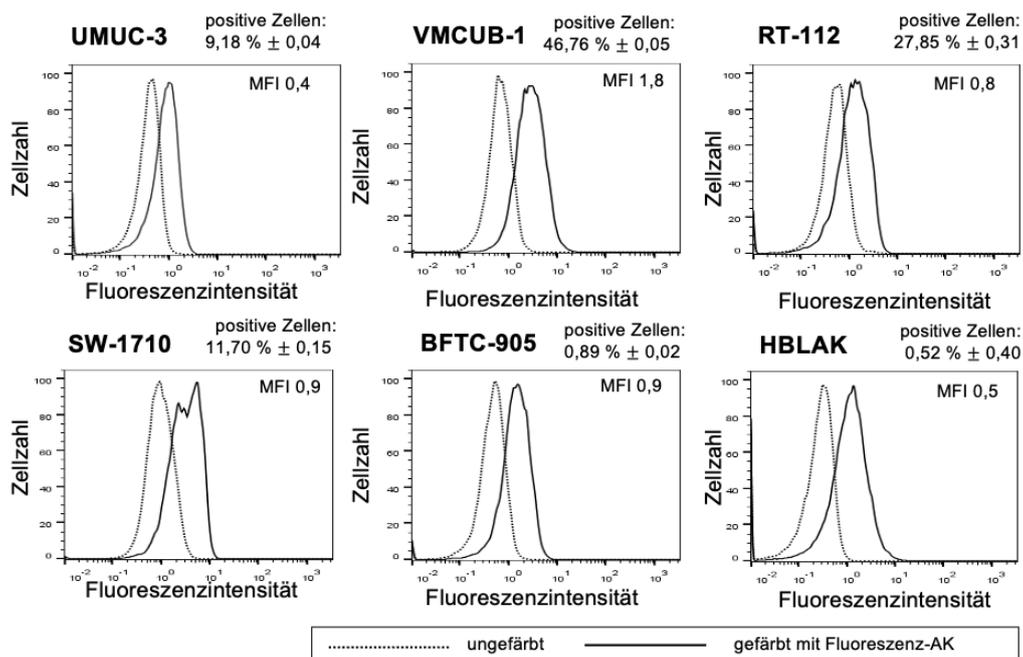
### 4.3.1 Abundanz der Epitope EGFR und CD44v6 nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren

Nach der Charakterisierung der Effekte epigenetischer Inhibitoren auf den Immunphänotyp sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob die Empfindlichkeit von UC-Zellen durch die Koinkubation mit CAR T-Zellen und deren Zytotoxizität gesteigert werden kann. Die spezifischen vom HNO-Forschungslabor entwickelten CARs richteten sich gegen *EGFR* und *CD44v6*. Daher wurde im Folgenden zunächst die Abundanz der CAR-Targets gemessen, die mittels Durchflusszytometrie ermittelt wurde.



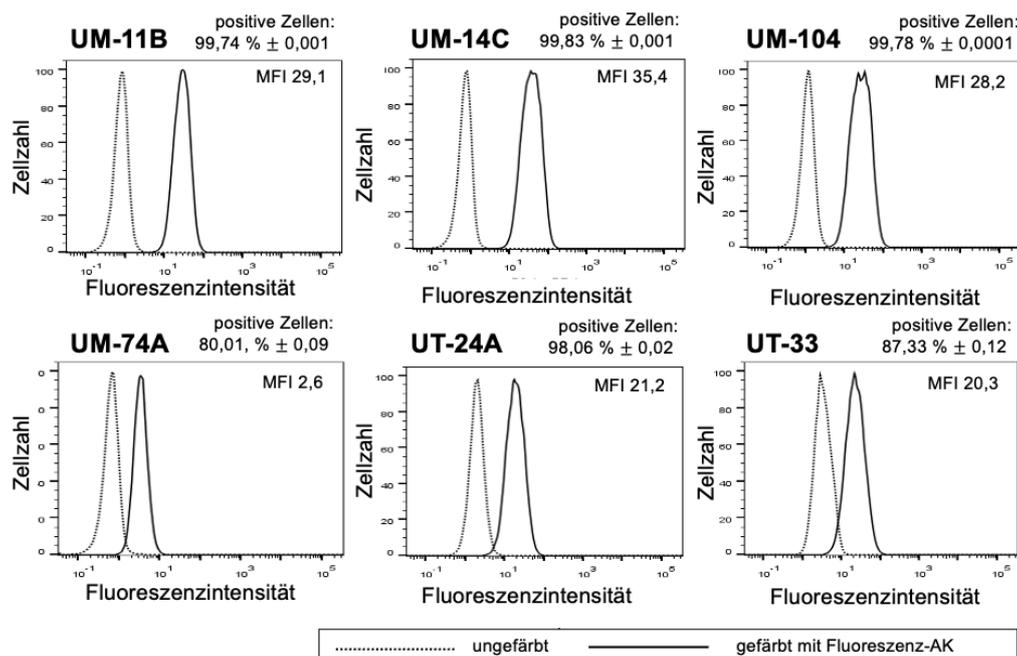
**Abbildung 4.23: Grundniveau von EGFR auf Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung.** Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für EGFR gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Die Ordinate ist normalisiert auf 100, die Abszisse spiegelt die Anzahl der für das Fluorochrom positiven vitalen Zellen an. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

Nach Antikörper-Färbung zeigten sich über alle dargestellten Zelllinien hinweg mindestens 60% aller vitalen Zellen für EGFR positiv. In UMUC-3, RT-112, SW-1710 und HBLAK waren es sogar über 90%.



**Abbildung 4.24:** Grundniveau von CD44v6 der Urothelkarzinomzelllinien sowie der Kontrollzelllinie HBLAK nach Antikörper-Färbung. Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für CD44v6 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

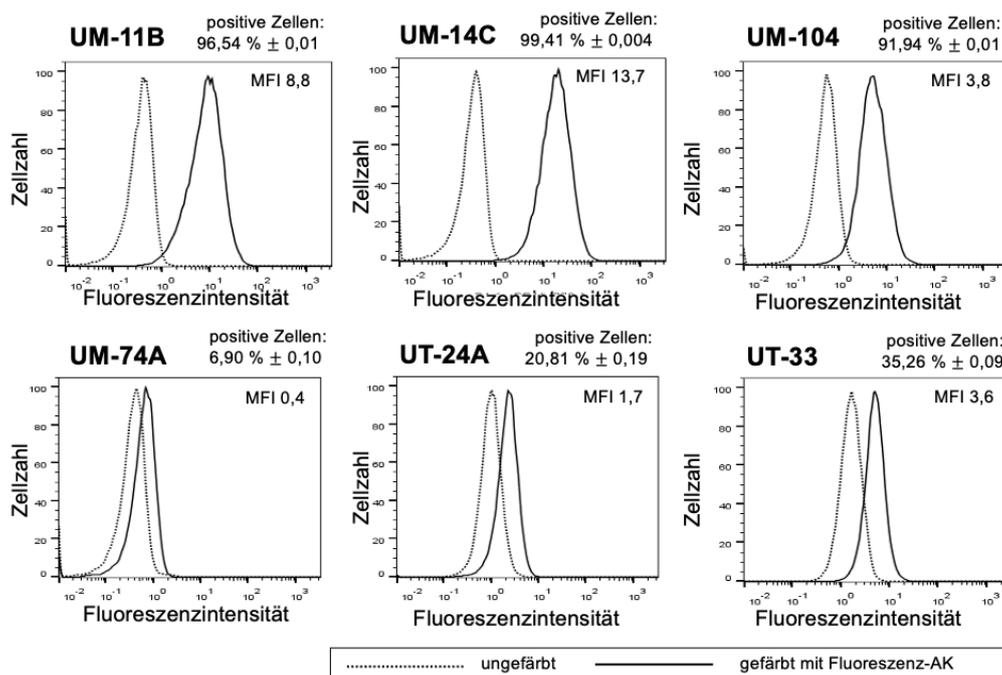
CD44v6 hingegen wurde etwas weniger stark auf UC-Zelllinien präsentiert. Hier waren nur weniger als 50% in VMCUB-1 positiv gefärbt für CD44v6. In den übrigen dargestellten Zelllinien war die Abundanz von CD44v6 geringer. Insgesamt wurde in allen dargestellten Zelllinien EGFR auf der Zelloberfläche detektiert, während sich dies für CD44v6 weniger stark ausgeprägt zeigte. Wie hoch das Proteinniveau von EGFR und CD44v6 in den HNSCC-Zelllinien ist, wird zum Vergleich im Folgenden dargelegt.



**Abbildung 4.25: Grundniveau von EGFR der HNSCC-Zelllinien nach Antikörper-Färbung.** Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für EGFR gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

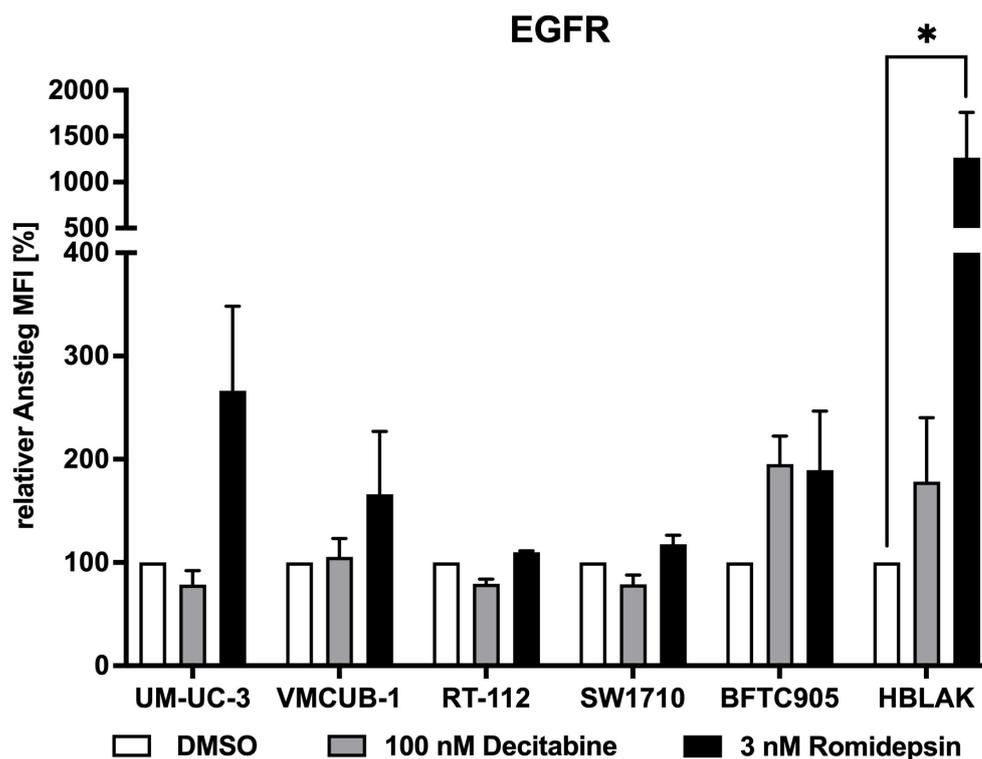
In UM-11B, UM-14C, UM-104 waren 99% der vitalen Zellen positiv für EGFR. Insgesamt zeigten sich über alle dargestellten HNSCC-Zelllinie hinweg mindestens 80% der Zellen positiv für EGFR.

Es fiel sowohl in den UC-Zelllinien als auch in den HNSCC-Zelllinien ein hohes Grundniveau von EGFR in unbehandelten Zellen auf.



**Abbildung 4.26: Grundniveau von CD44v6 der HNSCC-Zelllinien nach Antikörper-Färbung.** Die gestrichelte Linie stellt unbehandelte und ungefärbte Zellen dar, während die durchgehende Linie unbehandelte und mit Fluoreszenz-AK für CD44v6 gefärbte Zellen anzeigt. Die Messung erfolgte 72h nach Aussaat. Auf der y-Achse ist die Zellzahl aufgetragen, welche auf 100 normalisiert wurde, während auf der x-Achse die Fluoreszenzintensität abgebildet ist. Die Graphik wurde mit FlowJo erstellt.

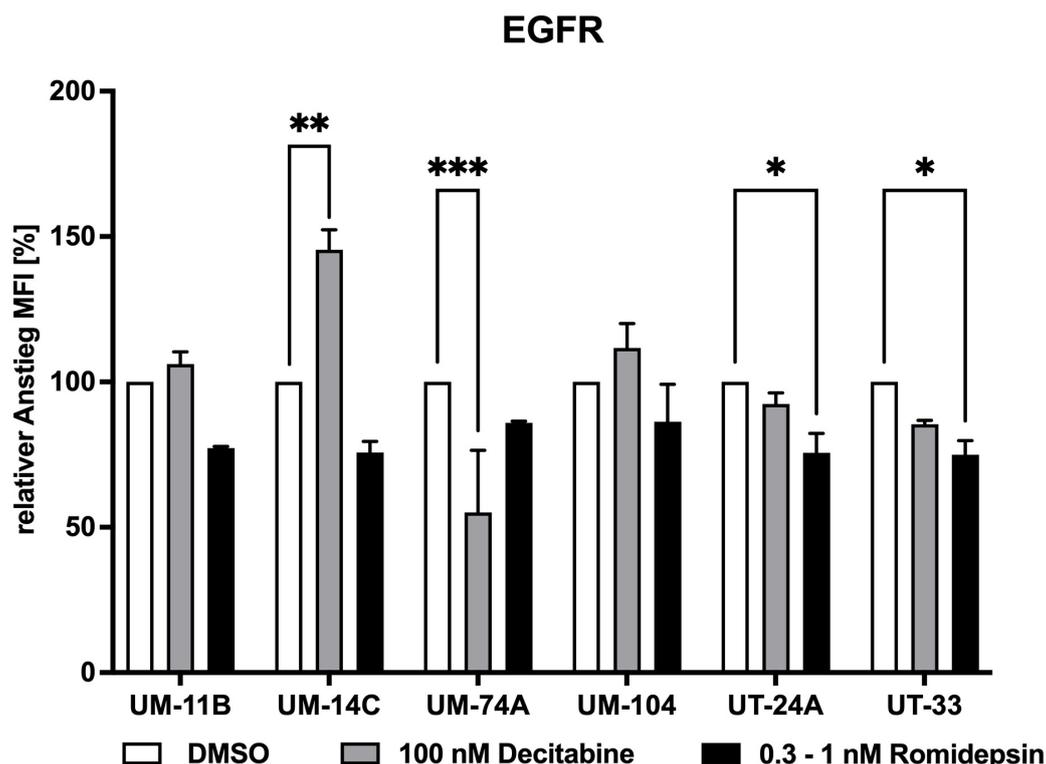
Auf der Oberfläche von UM-11B, UM-14C und UM-104 zeigten sich nach Antikörperfärbung mindestens 90% der vitalen Zellen positiv für CD44v6. Ein geringeres Niveau von CD44v6 fiel in UT-33, UT-24A und besonders in UM-74A auf. Insgesamt zeigte sich eine zelllinienabhängige Abundanz von CD44v6 in unbehandelten HNSCC- und UC-Zelllinien, dennoch waren alle Zelllinien positiv für die beiden CAR-Ziele. Sie eignen sich folglich als Angriffsziel für CAR-T-Zellen. Welche Auswirkungen die Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren auf die Proteinabundanz von EGFR und CD44v6 hat, wurde im Folgenden untersucht:



**Abbildung 4.27:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von EGFR in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung der Proteinexpression nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Die Proteinexpression ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Nach Decitabine-Behandlung fiel eine Steigerung von EGFR in HBLAK und BFTC-905 auf das Doppelte auf. Ansonsten war nach Decitabine-Behandlung kein signifikanter Effekt zu verzeichnen.

Die Behandlung mit Romidepsin bewirkte in der immortalisierten Urothelzelllinie HBLAK einen signifikanten Anstieg von EGFR auf mehr als das 10-fache im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Eine Verdoppelung von EGFR zeigte sich in den Urothelkarzinom-Zelllinien UMUC-3 und VMCUB-1 nach Behandlung mit Romidepsin. Auch in BFTC-905 war ein 1,6-facher Anstieg sichtbar, während in SW1710 und RT-112 keine signifikanten Effekte beobachtet werden konnten.

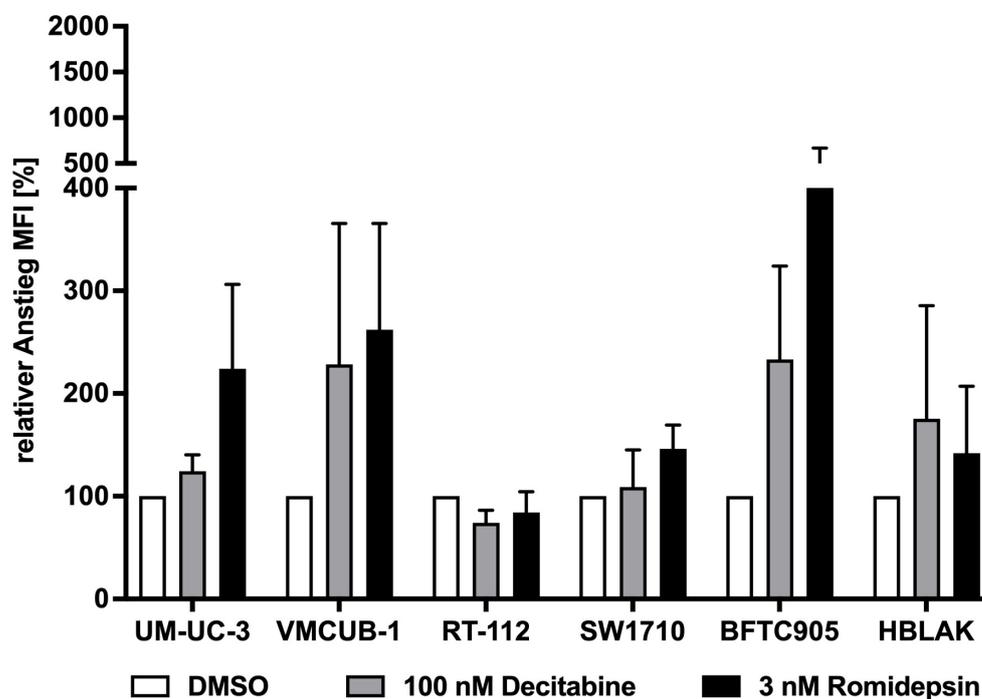


**Abbildung 4.28:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von EGFR in HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

In den HNSCC-Zelllinien war vergleichsweise ein geringerer Effekt der Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren ersichtlich. Nach Romidepsin-Behandlung zeigte sich kein Effekt auf EGFR und nach Decitabine-Behandlung war lediglich in der HNSCC-Zelllinie UM-14C ein leichter, aber sehr signifikanter Anstieg zu verzeichnen.

Vergleicht man die Induktion von EGFR durch die Behandlung der UC- und HNSCC-Zelllinie mit epigenetischen Inhibitoren, so fällt auf, dass insbesondere in den UC-Zelllinien und vor allem in der Kontrollzelllinie HBLAK durch die Behandlung mit dem HDACi Romidepsin eine Steigerung von EGFR erzielt werden konnte. In den HNSCC-Zelllinien war kaum ein Effekt durch die Behandlung mit Epidrugs erkennbar.

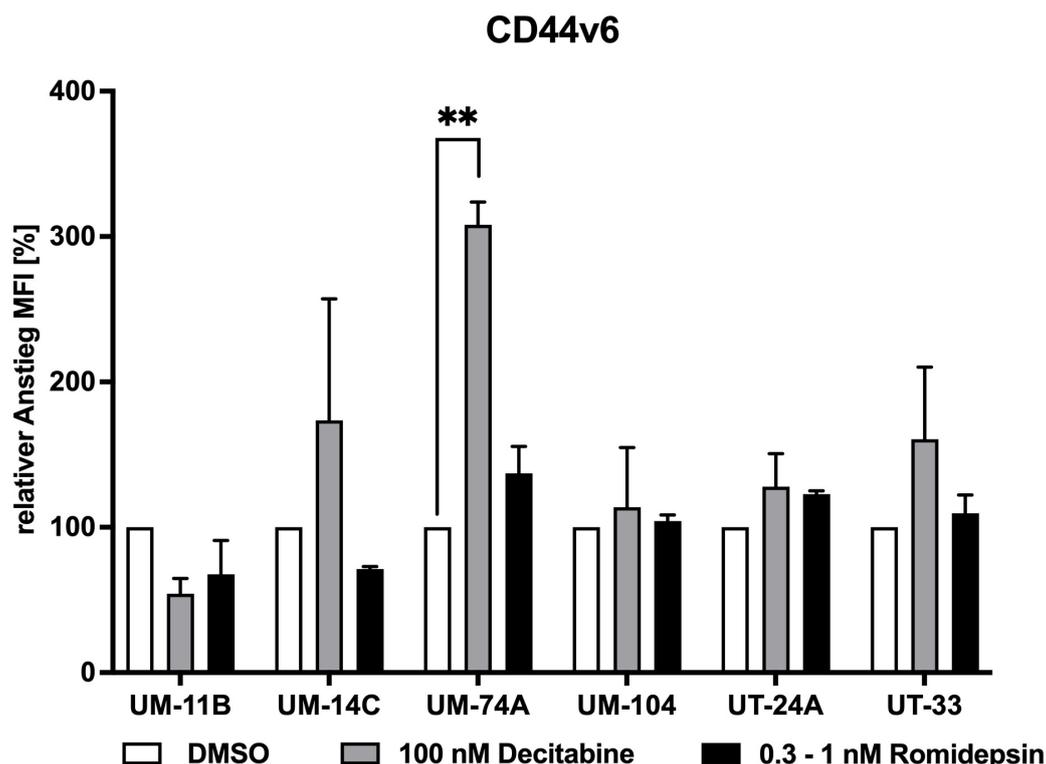
## CD44v6



**Abbildung 4.29:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von CD44v6 in Urothelkarzinom-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

Aufgrund hoher Standardabweichungen ließen sich keine signifikanten Auswirkungen der Behandlung mit Decitabine auf die Abundanz von CD44v6 erschließen. Die Behandlung mit Romidepsin schien einen Effekt auf die UC-Zelllinien BFTC-905, VMCUB-1 und UM-UC-3 zu erzielen, jedoch sind diese Ergebnisse aufgrund der Standardabweichung weniger verwertbar.

Es ließ sich insgesamt keine robuste Induktion von CD44v6 in den UC-Zelllinien nach Behandlung mit Epidrugs ableiten.



**Abbildung 4.30:** FACS-Analyse des Proteinniveaus von CD44v6 in HNSCC-Zelllinien nach Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren. Nach dreitägiger Behandlung mit 100 nM Decitabine oder der äquivalenten Dosis DMSO wurde das Proteinniveau mittels Antikörperfärbung am siebten Tag gemessen. Zur Bestimmung des Proteinniveaus nach einmaliger Romidepsin-Behandlung mit der angegebenen Dosis oder der äquivalenten Dosis DMSO wurden die Zellen nach 72h analysiert. Das Proteinniveau ist als relativer Anstieg der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, hier standardisiert auf 100, dargestellt. Weiße Balken stellen die DMSO-Kontrollen dar, schwarze Balken Romidepsin behandelte Zellen und graue Balken Zellen nach Decitabine-Behandlung.

In den HNSCC-Zelllinien war nach Decitabine-Behandlung eine dreifach erhöhte Proteinabundanz für CD44v6 in UM-74A sehr signifikant. Nach Romidepsin-Behandlung fiel in den dargestellten HNSCC-Zelllinien keine signifikante Steigerung von CD44v6 auf.

Insgesamt wurden CD44v6 und EGFR als Oberflächen-Antigene Zelllinien-abhängig detektiert und durch die Behandlungen mit den epigenetischen Inhibitoren unterschiedlich stark induziert.

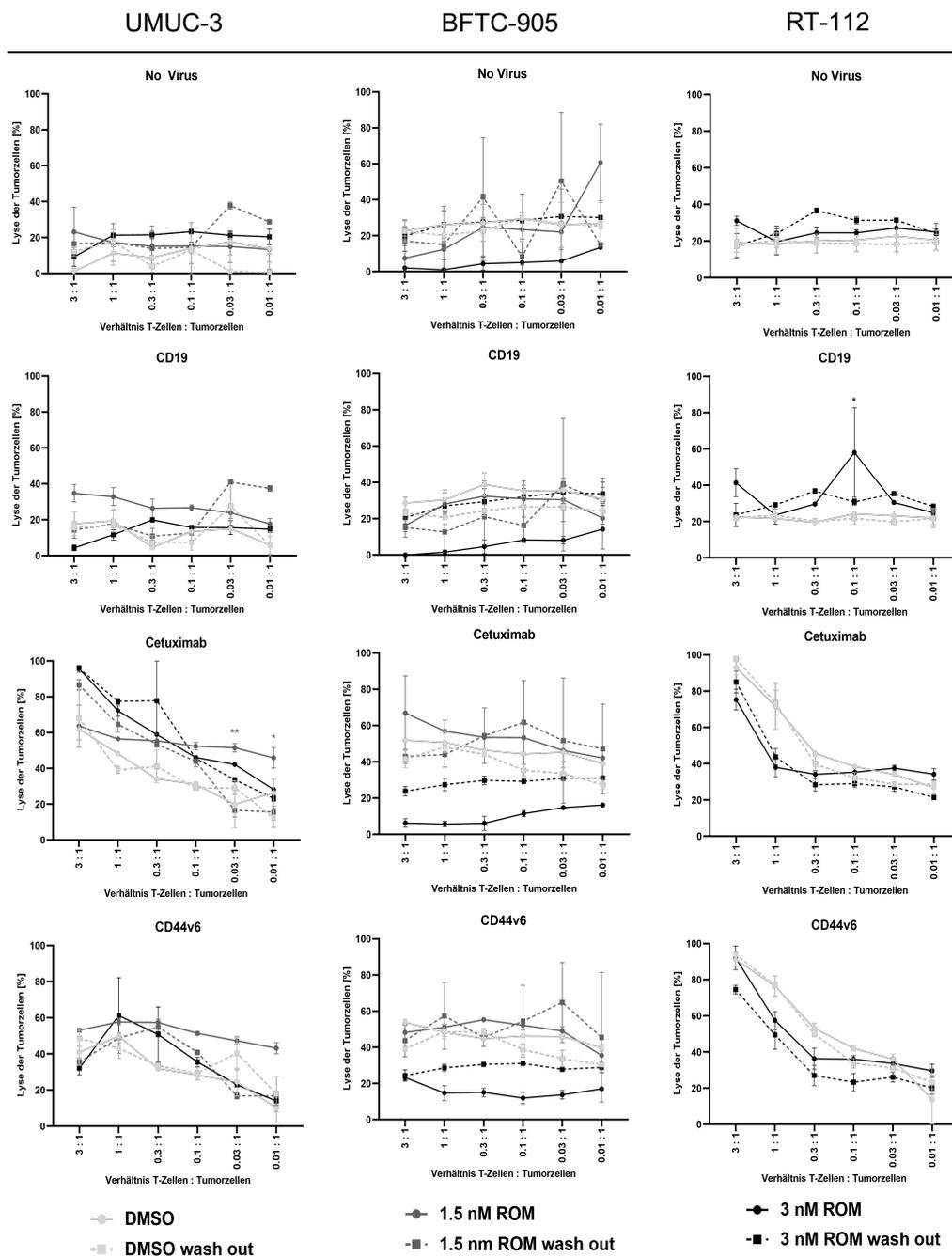
#### 4.3.2 Cytotoxizitäts-Test nach Koinkubation von CAR T –Zellen mit Romidepsin vorbehandelten Tumorzellen

In Vorversuchen aus dem urologischen Forschungslabor in Kooperation mit dem HNO Labor wurden bereits Cytotoxizitätstest nach Koinkubation von Tumorzellen (Urothelkarzinom- und HNSCC-Zelllinien) mit gegen EGFR und CD44v6 gerichtete CAR T-Zellen etabliert.

Für Decitabine konnte in Vorarbeiten [1] bereits ein verbessertes Killing von Decitabine behandelten UC-Zelllinien durch CAR T-Zellen beobachtet werden.

Jedoch war ein schlechteres Killing nach Behandlung mit dem HDACi Romidepsin nicht erklärbar. Als mögliche Ursache käme eine bereits bei Nanomolar-Konzentrationen hohe zytotoxische Wirkung von Romidepsin infrage. Um auszuschließen, dass die CAR-T-Zellen Kontakt zum hochtoxisch wirkenden HDACi haben, wurde im Folgenden ein Wash Out Versuch durchgeführt.

Dieser beinhaltete einen zusätzlichen Waschvorgang der Tumorzellen inklusive Mediumwechsel vor Zugabe der CAR T-Zellen, um das Romidepsin-haltige Medium zu verwerfen. Zum direkten Vergleich wurden parallel Versuchsansätze nach dem bisherigen Protokoll ohne Waschschrift durchgeführt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 4.31: Zytotoxizitätstest der Zelllinien UMUC-3, BFTC-905 und RT-112 nach 16h Koinkubation mit CAR T-Zellen gegen EGFR (Cetux: Cetuximab) und CD44v6. CAR T-Zellen gegen CD19 und untransfizierte Zellen (NV: no virus) dienen als Negativkontrolle. Die Tumorzellen wurden 3d vor Koinkubation mit den T-Zellen mit 1.5 bzw. 3 nM Romidepsin oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Die y-Achse gibt die Lyse der Tumorzellen in Prozent an, während die x-Achse das Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen darlegt.**

Es wurden verschiedene Konzentrationen des HDACi Romidepsin verglichen, sowie der Wash Out Versuch aufgeführt. Für den Wash Out Versuch stellten sich keine deutlichen Unterschiede oder Verbesserungen der Messwerte heraus, lediglich in Hinsicht auf die Graphen, bei denen die Zelllinie UMUC-3 mit 1,5 nM

Romidepsin behandelt wurde, fiel in der Wash Out Kurve ein schwach signifikant besseres Lyse-Ergebnis für den Cetuximab-CAR auf.

Insgesamt war bei der Zelllinie **UMUC-3** im höchsten Verhältnis von T- zu Tumorzellen die Lyse der Tumorzellen am effektivsten, während die Kurve für die einzelnen CARs abflachte je weniger T-Zellen mit den Tumorzellen koinkubiert wurden. Diese Abflachung der Kurve fand sich nicht in den Kontrollen „No Virus“ und dem CAR für CD19 wieder, da hier auch eher ein geringer bzw. kein Effekt auf die Lyse der Tumorzellen erwartet wurde. Eine verstärkte Cytotoxizität gegenüber den Tumorzellen wurde für den CAR Cetuximab mit ansteigender Konzentration Romidepsin beobachtet, während dies für den CD44v6-CAR nicht der Fall war.

Insgesamt zeigten sich vergleichbare Graphen für die Toxizitätsmessungen mit und ohne Wash Out Versuch. Es konnte also angenommen werden, dass ein zusätzlicher Waschschrift vor Zugabe der transfizierten T-Zellen keinen relevanten Einfluss auf die Messergebnisse nahm.

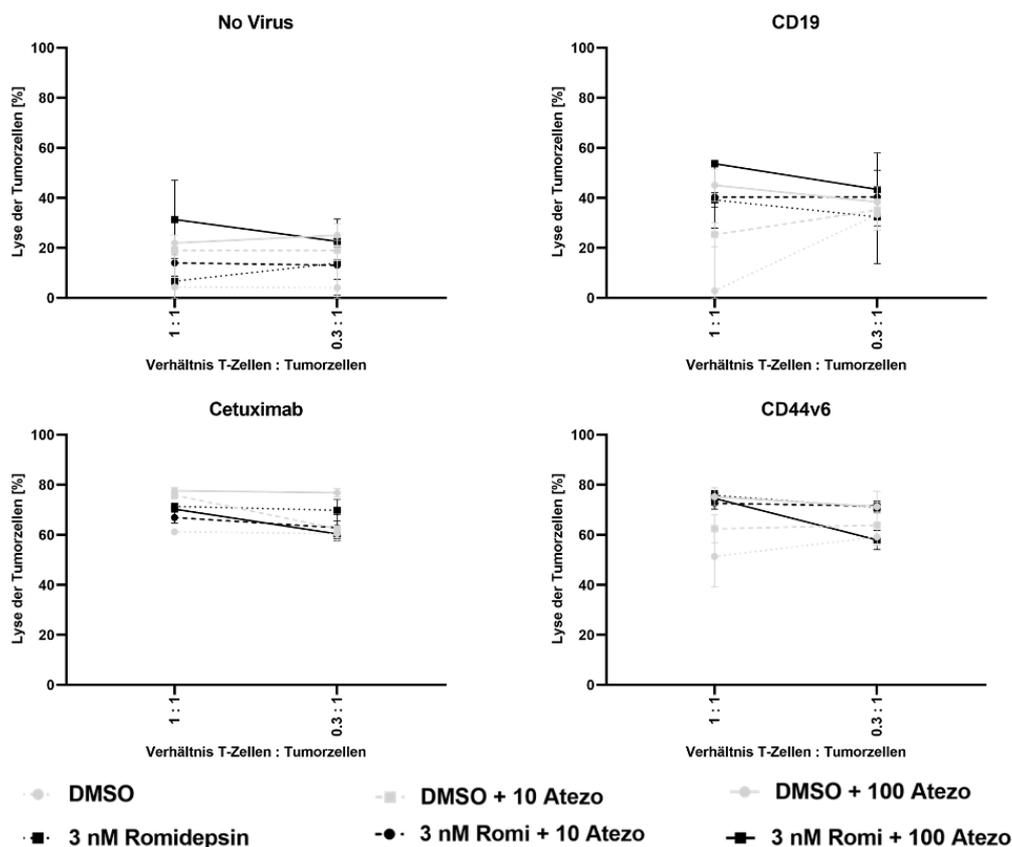
Für die Zelllinie **BFTC-905** fiel im Vergleich zur UC-Zelllinie UMUC-3 auf, dass die Behandlung mit Romidepsin eine deutlich geringere Auswirkung auf die Cytotoxizität gegenüber den Tumorzellen nach Koninkubation mit CAR-T-Zellen aufwies. Zudem war in BFTC-905 keine deutliche Abgrenzung bezüglich der CARs für Cetuximab (EGFR) und CD44v6 sichtbar, während in UMUC-3 der Cetuximab-CAR prozentual mehr Tumorzellen lysieren konnte. Auch hier führte der *Wash Out* Versuch zu keinen verbesserten Ergebnissen.

In allen Graphen der Zelllinie **RT-112** führten die T-Zellen mit den CARs für CD44v6 und Cetuximab zu einer Lyse von über 80% der Tumorzellen, jedoch zeigte sich für die Zelllinie RT-112 eine etwas schlechter Zelllyse nach Behandlung mit Romidepsin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Auch hier waren keine nennenswerten Unterschiede zum *Wash Out* Versuch abgrenzbar.

Zusammenfassend fiel auf, dass die UC-Zelllinien UMUC-3 und RT-112 durch die zielgerichteten CARs (CD44v6 und Cetuximab) der koinkubierten T-Zellen eine stärkere Zelllyse aufwiesen als die UC-Zelllinie BFTC-905.

Nach dem Washout-Versuch erfolgten erste Vorversuche mit dem Checkpointinhibitor Atezolizumab, welcher bereits in anderen Tumorentitäten in der Klinik angewandt wird. Hierzu lagen bisher keine Versuche vor, weshalb es sich im Folgenden um erste Erfahrungen mit Atezolizumab und den UC-Zelllinien in vitro handelt. Da für UC-Zelllinien keine Dosierung aus Vorversuchen vorlag, starteten erste Versuche mit zwei unterschiedlichen Dosierungen, um eine Tendenz festlegen zu können, in welchem Spektrum Atezolizumab sich wirksam zeigt.

Für die ersten Versuche mit dem Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab wurde die UC-Zelllinie UMUC-3 ausgewählt, da diese nach Behandlung mit Romidepsin eine deutlich verstärkte Expression von PD-L1 und PD-L2 aufwies.



**Abbildung 4.32: Zytotoxizitätstest der Zelllinie UMUC-3 nach 16h Koinkubation mit CAR T-Zellen gegen EGFR (Cetux: Cetuximab) und CD44v6. CAR T-Zellen gegen CD19 und untransfizierte Zellen (NV: no virus) dienen als Negativkontrolle. Die Tumorzellen wurden 3d vor Koinkubation mit den T-Zellen mit 3 nM Romidepsin oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 10 µg oder 100 µg des Checkpoint-Inhibitors Atezolizumab 8h vor Koinkubation mit den T-Zellen behandelt. Die y-Achse gibt die Lyse der Tumorzellen in Prozent an, während die x-Achse das Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen darlegt.**

Für den Vorversuch mit dem PD-L1-Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab wurde eine niedrigere (10 µg) und eine höhere Konzentration (100 µg) gewählt. Da sich in bisherigen Zytotoxizitätstests mit CAR T-Zellen die meisten Effekte in den höheren Verhältnissen von T-Zellen zu Tumorzellen zeigten, wurden für diesen Vorversuch zur Übersicht nur diese beiden Verhältnisse gewählt.

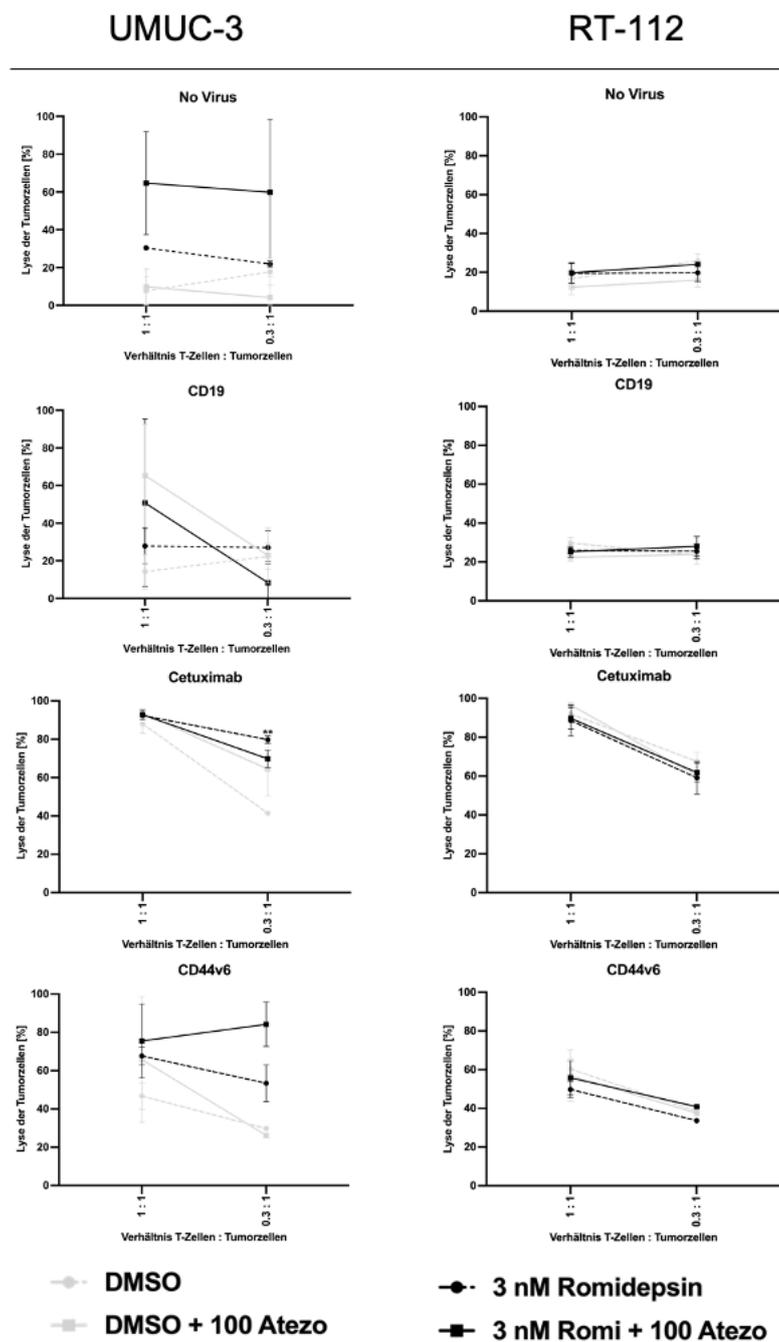
Bei Gabe von DMSO mit Atezolizumab zeigt sich im Vergleich zu den nur mit Lösungsmittel behandelten Kontrollgruppe durch die Zugabe des Checkpoint-Inhibitors eine vermehrte Lyse von Tumorzellen für alle aufgeführten CARs. Für die CARs gegen Cetuximab und CD44v6 führte auch die Behandlung mit DMSO und 100 µg Atezolizumab zu einer vermehrten Lyse von Tumorzellen.

Letztendlich lassen sich durch die Zugabe von 100 µg Atezolizumab ähnliche Effekte auf die Tumorzelllyse bewirken wie durch das hochzytotoxische Romidepsin. Die Zugabe von 100 µg Atezolizumab zur Behandlung mit Romidepsin lässt sich aufgrund der Standardabweichung erschwert beurteilen, jedoch fiel für

den CAR gegen CD19 eine höhere Zelllyse im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Romidepsin auf.

Für eine Behandlung mit 10 µg zeigten sich insgesamt geringere Effekte als für die Zugabe von 100 µg Atezolizumab, weshalb im Folgenden lediglich die höhere Dosierung angewandt wird.

Insgesamt schienen 100 µg des Checkpoint-Inhibitors Atezolizumab wirksamer zu sein. Da die Wirkung des Checkpoint-Inhibitors durch eine möglicherweise zu lange Inkubationszeit von 8 h in dem verwendeten Medium (DMEM + 10% FCS) nicht die optimalen Bedingungen für die maximale Wirkung erzielen konnte, erfolgte eine erneute Messreihe mit einer kürzeren Inkubationszeit von 4 h.



**Abbildung 4.33: Zytotoxizitätstest der Zelllinie UMUC-3 und RT-112 nach 16h Koinkubation mit CAR T-Zellen gegen EGFR (Cetux: Cetuximab) und CD44v6. CAR T-Zellen gegen CD19 und untransfizierte Zellen (NV: no virus) dienen als Negativkontrolle. Die Tumorzellen wurden 3d vor Koinkubation mit den T-Zellen mit 3 nM Romidepsin oder DMSO als Lösungsmittelkontrolle behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen mit 100  $\mu$ g des Checkpoint-Inhibitors Atezolizumab 4h vor Koinkubation mit den T-Zellen behandelt. Die y-Achse gibt die Lyse der Tumorzellen in Prozent an, während die x-Achse das Verhältnis von T-Zellen zu Tumorzellen darlegt.**

Hier betrug die Behandlungsdauer der Zelllinie UMUC-3 mit 100  $\mu$ g Atezolizumab nur 4 Stunden im Vergleich zum vorigen Versuch aus Abb. 4.32. Aufgrund der

hohen Standardabweichung der mit 100 µg Atezolizumab behandelten Tumorzellen ist die Aussagekraft hier schwer zu bewerten.

Insgesamt war das Killing nach Romidepsin-Behandlung schlechter als in der DMSO-Kontrolle, jedoch war ein vermeintlich besseres Killing durch den Cetuximab-CAR nach Gabe von DMSO und 100 µg Atezolizumab erkennbar. Für den CAR gegen CD44v6 zeigte sich (soweit beurteilbar) das beste Killing für die Kombination aus Romidepsin und Atezolizumab.

Zum Vergleich wurde die Zelllinie RT-112 hinzugezogen. Insgesamt konnte auch bei der UC-Zelllinie RT-112 kein wesentlicher Unterschied des Killings mit oder ohne Behandlung mit dem Checkpoint-Inhibitor Atezolizumab nachgewiesen werden.

#### 4.4 RNA-Sequenzierung nach Behandlung mit Decitabine

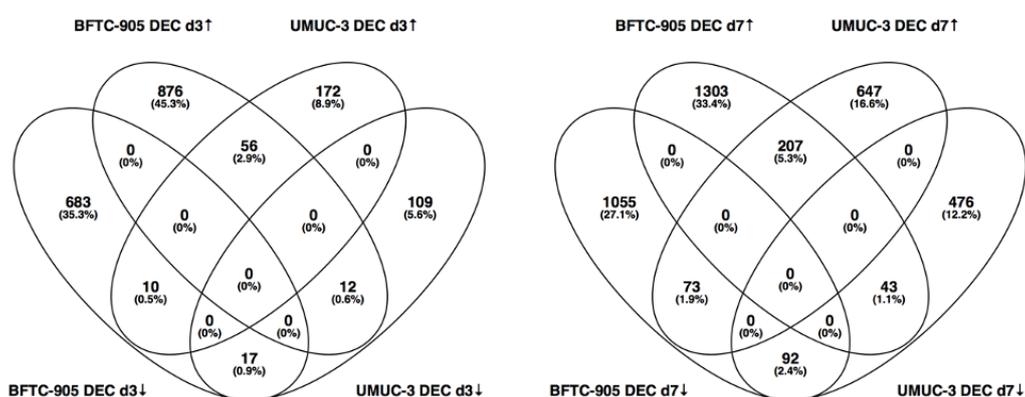
In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Grunewald et al., [1]) zeigte sich in Cytotoxizitätstests nach Inkubation mit CAR T-Zellen für die Zelllinie BFTC-905 eine verstärkte Zelllyse nach Vorbehandlung der UC-Zellen mit Decitabine. Im Gegensatz zu allen anderen untersuchten UC-Zelllinien wurden unbehandelte BFTC905-Zellen nur sehr schlecht von den CAR T-Zellen targetiert. Um weitere hieran beteiligte Faktoren durch eine Screeninganalyse zu identifizieren, wurde eine globale Transkriptomanalyse mittels RNA Sequenzierung im BMFZ durchgeführt. Zum Vergleich wurde parallel die Zelllinie UM-UC-3 analysiert, da diese im unbehandelten Zustand bereits gut durch CAR T-Zellen targetiert wurde, jedoch auch hier eine zusätzliche Verbesserung durch Decitabine-Vorbehandlung erreicht werden konnte. Zusätzlich wurde die HNSCC-Zelllinie UT-33 untersucht, weil diese durch eine schlechtere Zelllyse in Cytotoxizitätstest aufgefallen war. Dazu wurde drei und sieben Tage nach Behandlung mit 100 nM Decitabine bzw. DMSO RNA extrahiert und dem BMFZ für die RNA Sequenzierung zur Verfügung gestellt. Diese Analyse diente dazu, weitere Faktoren zu identifizieren, welche eine wichtige Rolle bezüglich des verbesserten Killings von Tumorzellen durch CAR-T-Zellen beitragen könnten. Nachfolgend sind Auswertungen der differentiellen Genexpression dargestellt:

**Tabelle 4.1: signifikant differentiell exprimierte Gene nach Behandlung mit DEC (Decitabine). Die folgenden Kriterien wurden hierbei erfüllt: Fold-Change  $\geq 1,5$  und Bonferoni  $p \leq 0,05$  ( $\uparrow$  = erhöht,  $\downarrow$  = erniedrigt).**

Zelllinie	3d DEC $\uparrow$	3d DEC $\downarrow$	7d DEC $\uparrow$	7d DEC $\downarrow$
UMUC-3	238	166	927	750
BFTC-905	944	946	1553	2076
UT-33	123	8	158	13

Durch die Decitabine-Behandlung wurden in BFTC-905 nach sieben Tagen deutlich mehr Gene differentiell exprimiert als in UMUC-3. Insgesamt wurden über alle drei Zelllinien hinweg nach sieben Tagen mehr Gene verändert exprimiert als nach drei Tagen. Für die HNSCC-Zelllinie UT-33 zeigen sich die Auswirkungen der Decitabine-Behandlung wesentlich geringer als für die aufgeführten UC-Zelllinien.

Um eine Vergleichbarkeit der Genregulation durch Decitabine-Behandlung in den Zelllinien BFTC-905, UMUC-3 und UT-33 zu erzielen, wurde mithilfe eines OnlineTools eine Überschneidung der durch Behandlung hoch- oder herabregulierten Genexpression dargestellt. Eine Tabelle mit allen aufgeführten Gennamen findet sich im Anhang.



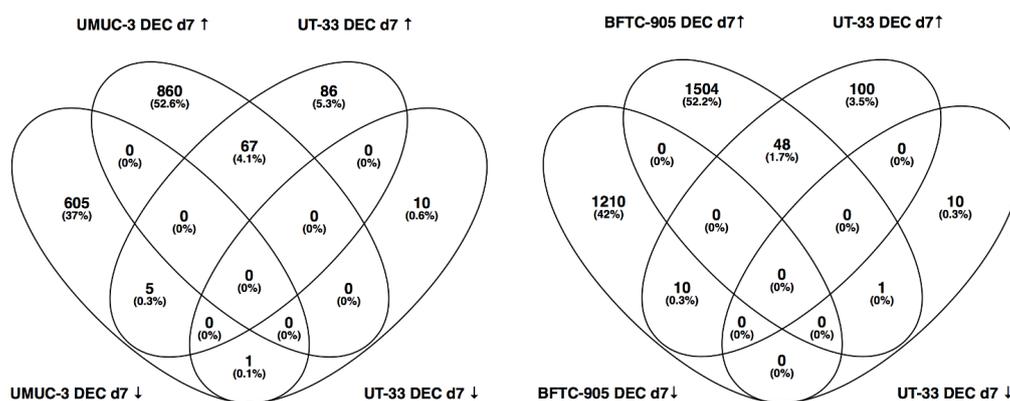
**Abbildung 4.34: Überschneidungen der vermehrt oder vermindert exprimierten Gene in BFTC-905 und UMUC-3 drei und sieben Tage nach Decitabine-Behandlung. Die Auswertung und Graphik wurde mit dem Online-Tool Venny 2.1 erstellt. [49]**

Sieben Tage nach Behandlung mit Decitabine wurden sowohl in UMUC-3 als auch in BFTC-905 207 Gene gemeinsam signifikant vermehrt exprimiert. Nach drei Tagen waren es nur 56 gemeinsam vermehrt exprimierte Gene. Hierunter finden sich u.a. Cancer/Testis Antigene wie *MAGEB2* (*MAGE Family Member B2*), *MAGEA4*, aber auch Surrogatmarker für den Viral Mimicry Signalweg wie *IFI27*, *IFIT1*, *IFIT3*, *OAS2*, *ISG15*. Ebenfalls wurden HLA-II assoziierte Gene wie *CD74* oder Komplement-assoziierte Gene wie *CD93* exprimiert. *DNMT1* ist ebenso in beiden Zelllinien nach sieben Tagen erhöht. Das Gen *NEK2* (*NIMA Related Kinase 2*), welches u.a. zuständig für die Mitose-Regulation ist, wurde auch gemeinsam verstärkt exprimiert.

Eine gegenläufige Expression zeigte sich z.B. für *G0S2* (*G0/G1 Switch Regulatory Protein 2*), welches mit der Apoptose assoziiert ist, sowie *HBEGF* (*Heparin Binding EGF Like Growth Factor*), welche in BFTC-905 nach drei Tagen hochreguliert, in UMUC-3 jedoch herabreguliert wurde.

Nach sieben Tagen wurden u.a. die Toll-like Rezeptoren 3 und 6 (*TLR3*, *TLR6*), welche Immunreaktionen steuern, in BFTC-905 nach Decitabine-Behandlung vermehrt exprimiert und in UMUC-3 vermindert.

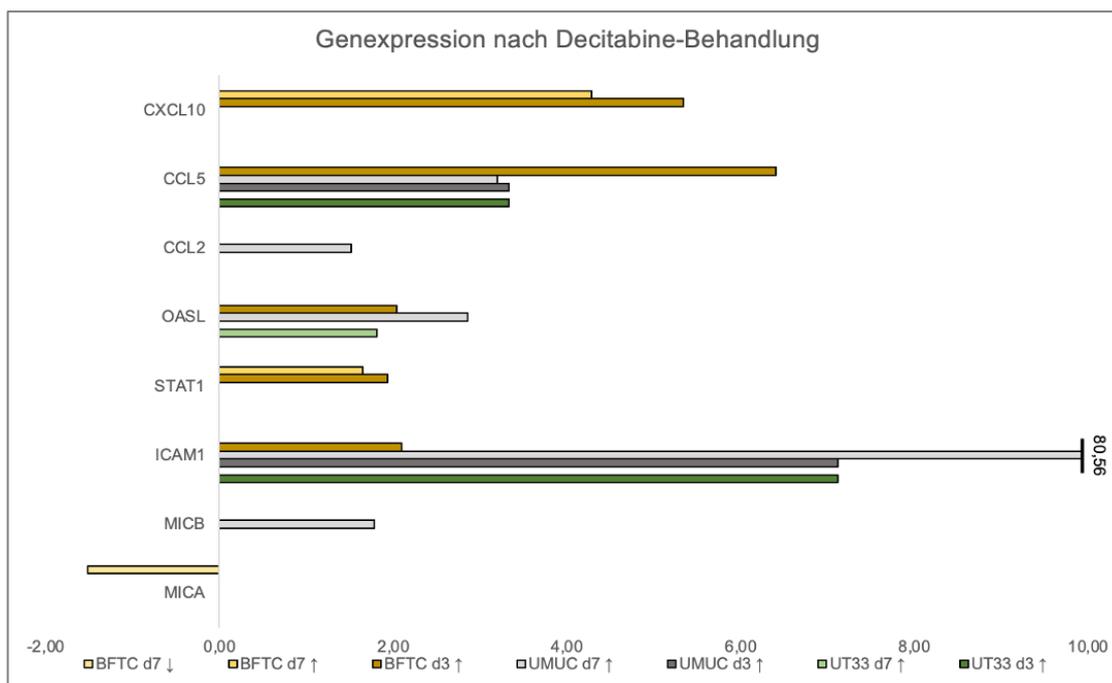
In UMUC-3 hingegen wurde sieben Tage nach Decitabine-Behandlung u.a. das Adhäsionsmolekül *ICAM5*, *PDGFA* (*Platelet Derived Growth Factor Subunit A*) als Wachstumsfaktor für Zellproliferation, Migration und Chemotaxis und *PTK6* (*Protein Tyrosine Kinase 6*), welches wichtiger Bestandteil von Signalkaskaden für die Differenzierung von Epithelzellen darstellen, vermehrt exprimiert. Diese Gene wurden jedoch in BFTC-905 nach sieben Tagen Behandlung im Gegensatz dazu vermindert exprimiert.



**Abbildung 4.35: Überschneidungen der vermehrt oder vermindert exprimierten Gene in den UC-Linien UMUC-3 und BFTC-905 im Vergleich zur HNSCC-Linie UT-33 sieben Tage nach Decitabine-Behandlung. Die Auswertung und Graphik wurde mit dem Online-Tool Venny 2.1 erstellt. [49]**

Im Vergleich einer UC-Zelllinie mit einer HNSCC-Zelllinie zeigen sich sieben Tage nach Behandlung deutlich weniger gemeinsam vermehrt exprimierte Gene. In UMUC-3 und UT-33 werden durch die Behandlung mit dem DNMTi insgesamt 67 Gene auf beiden Zelllinien hochreguliert u.a. *XAGE1B* (*Cancer/Testis Antigen Family 12*), während es bei BFTC-905 und UT-33 nur 48 gemeinsam differentiell exprimierte Gene u.a. *TNF* nach Behandlung sind. In allen drei Zelllinien gemeinsam hochreguliert wird *TNFRSF6B*, welcher eine Art „Rezeptorattrappe“ oder „Köder-Rezeptor“ (Decoy Receptor) für den *Fas*-Ligand darstellt und vor Apoptose schützt. Ein „Köder-Rezeptor“ ist ein Rezeptor, der seinen Liganden zwar bindet, aber keine Signale weiterleitet.

Von den in 4.2 via FACS oder qPCR analysierten Faktoren wurden folgende Expressionsveränderung nach Decitabine-Behandlung mittels RNA-Sequenzierung gemessen:



**Abbildung 4.36: Differentielle Genexpression von Faktoren, deren Expression bereits zuvor über andere Methoden erhoben wurde. Signifikante Genexpressionsveränderungen drei oder sieben Tage nach Behandlung mit Decitabine in den drei untersuchten Zelllinien wurde mittels RNA Sequenzierung gemessen. Aufgetragen ist der Fold Change, nur Gene mit Fold Change  $\geq 1,5$  und p-Wert  $\leq 0,05$  nach Bonferoni Korrektur sind angegeben.**

Besonders auffällig war die vermehrte Expression von *ICAM-1* sieben Tage nach Behandlung mit Decitabine in der UC-Zelllinie UMUC-3, welche im Vergleich zu allen anderen aufgeführten Messergebnissen eine übermäßig stark vermehrte Expression aufwies. Drei Tage nach Decitabine-Behandlung wurde *ICAM-1* in UMUC-3 bereits signifikant höher exprimiert, nach sieben Tagen war der Effekt jedoch mehr als verzehnfacht. In den FACS-Analysen wurde ebenso eine erhöhte Proteinexpression für *ICAM-1* sieben Tage nach DEC-Behandlung festgestellt. In UT-33 und BFTC-905 war lediglich drei Tage nach Decitabine-Behandlung eine vermehrte Expression von *ICAM-1* ersichtlich, welche nach sieben Tagen nicht mehr nachweisbar war.

*STAT1* wird hier in BFTC-905 sowohl nach drei und sieben Tagen Behandlung vermehrt exprimiert. In der PCR konnte dies nicht nachgewiesen werden.

Für *OASL* zeigt ich hier eine vermehrte Expression in UMUC-3 nach sieben Tagen und BFTC-905 nach drei Tagen Behandlung mit Decitabine, was sich für die Zelllinie BFTC-905 nicht so ausgeprägt in den PCR-Daten widerspiegelt.

In UMUC-3 fiel hier sieben Tage nach Decitabine-Behandlung eine vermehrte Expression von *CCL2* auf, dies korreliert nicht mit den PCR-Daten, wo nach Behandlung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle keine starke Änderung der Expression von *CCL2* auffiel.

Sowohl in der oben dargestellten Abbildung sowie in den PCR-Daten fiel in BFTC-905 nach Behandlung mit Decitabine eine deutlich stärkere Expression

von *CXCL10* auf. Die PCR-Daten korrelieren ebenfalls bezüglich der Expression von *CCL5*, welches vermehrt in UMUC-3 und BFTC-905 nach Decitabine-Behandlung vorkam.

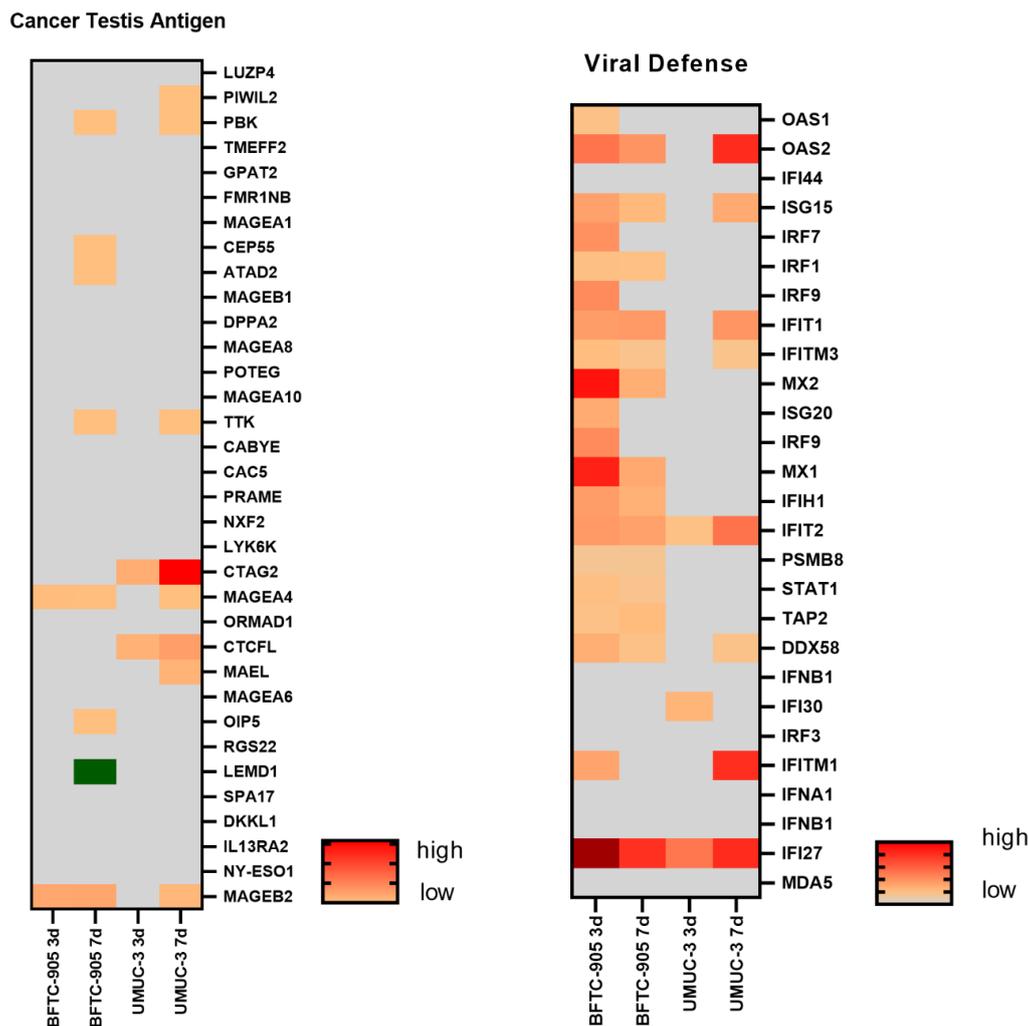
Zusammenfassend korrelieren die meisten Messergebnisse der RNA-Sequenzierung mit den zuvor erhobenen PCR- und FACS-Daten, lediglich für *CCL2* und *STAT1* kam es zu Abweichungen.

Um herauszufinden, wie bestimmte Immun-Prozesse reguliert sind, dienten die Genlisten vom *Broad Institute GSEA gene sets database* (<https://www.gseamsigdb.org/gsea/msigdb/genesets.jsp?collection=CP> : KEGG), welche mit den signifikant differentiell exprimierten Genen aus der RNA-Sequenzierung verglichen wurden.

Im Folgenden wurde zur besseren Übersicht eine Heat-Map erstellt, um eine Darstellung über hoch- und herunterregulierte Gene nach Behandlung mit Decitabine zu erhalten.

Interessant waren hier Marker für das *Antigen-Processing*, eine Interferonantwort, *Immune-cell inflammation* sowie Chemokin-Ausschüttung. Ebenso enthielt die RNA-Sequenzierung Daten zu Checkpoints, Cancer-Testis-Antigenen sowie Surrogatmarkern für den Ablauf einer virus-ähnlichen Immunantwort (*ERV-Signature*, *Viral Defense*).

Im Folgenden werden RNA-Sequenzierungsdaten dargelegt, welche die Auswirkung der Behandlung mit Decitabine auf die Expression von *Cancer Testis* Antigenen sowie Parametern für den Ablauf einer virusähnlicher Immunreaktion drei und sieben Tage nach Behandlung aufgeführt.

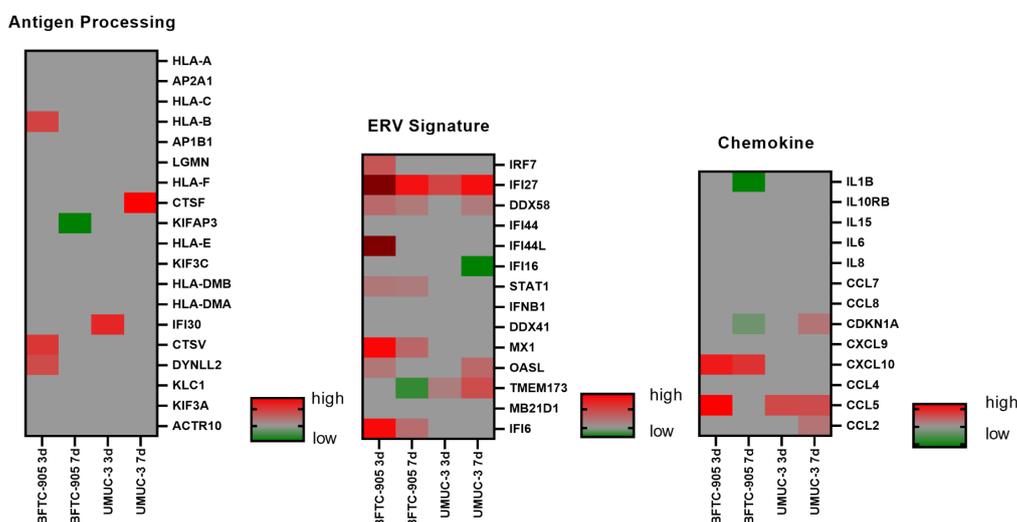


**Abbildung 4.37:** Heat-Map aus RNA-Sequenzierungsdaten der Zelllinien BFTC-905 und UMUC-3 drei und sieben Tage nach Decitabine-Behandlung. Eine vermehrte Genexpression wird rot dargestellt (je dunkler desto höher die Expression), eine verminderte Expression erscheint grün. Graue Kästchen weisen keine veränderte Genexpression durch Decitabine-Behandlung auf. Farblich gekennzeichnet sind nur Gene mit Fold Change  $\geq 1,5$  und p-Wert  $\leq 0,05$  nach Bonferoni Korrektur.

Cancer Testis Antigene werden physiologisch nur im Hoden exprimiert und in verschiedenen Tumorarten wie beispielsweise dem Melanom, Blasen-, Lungen- und Leberkarzinom reaktiviert. Da Cancer Testits Antigene auch eine Rolle bei der Umgehung des Immunsystems und der Metastasierungsfähigkeit spielen, sind sie ein zunehmend wichtiges therapeutisches Ziel [50] und auch für diese Arbeit von hohem Interesse.

In BFTC-905 war vor allem MAGEB2 (*MAGE Family Member B2*) und MAGEA4 (*MAGE Family Member B4*) durch Behandlung mit Decitabine nach drei und sieben vermehrt exprimiert. In UMUC-3 fiel vor allem ein deutlicher Anstieg von CTAG2 (*Cancer Testis Antigen 2*) nach sieben Tage Decitabine-Behandlung auf. Eine deutlich stärkere Hochregulation fiel für Marker der viralen Abwehr auf. Hier war insbesondere IFI27 (*Interferon Alpha Inducible Protein 27*) auffällig, welches

durch Decitabine-Behandlung sowohl in BFTC-905 als auch in UMUC-3 neben vielen anderen Markern am stärksten indiziert wurde. *IFI27* gilt vor allem als Teil von Signalwegen, die zur Apoptose führen.



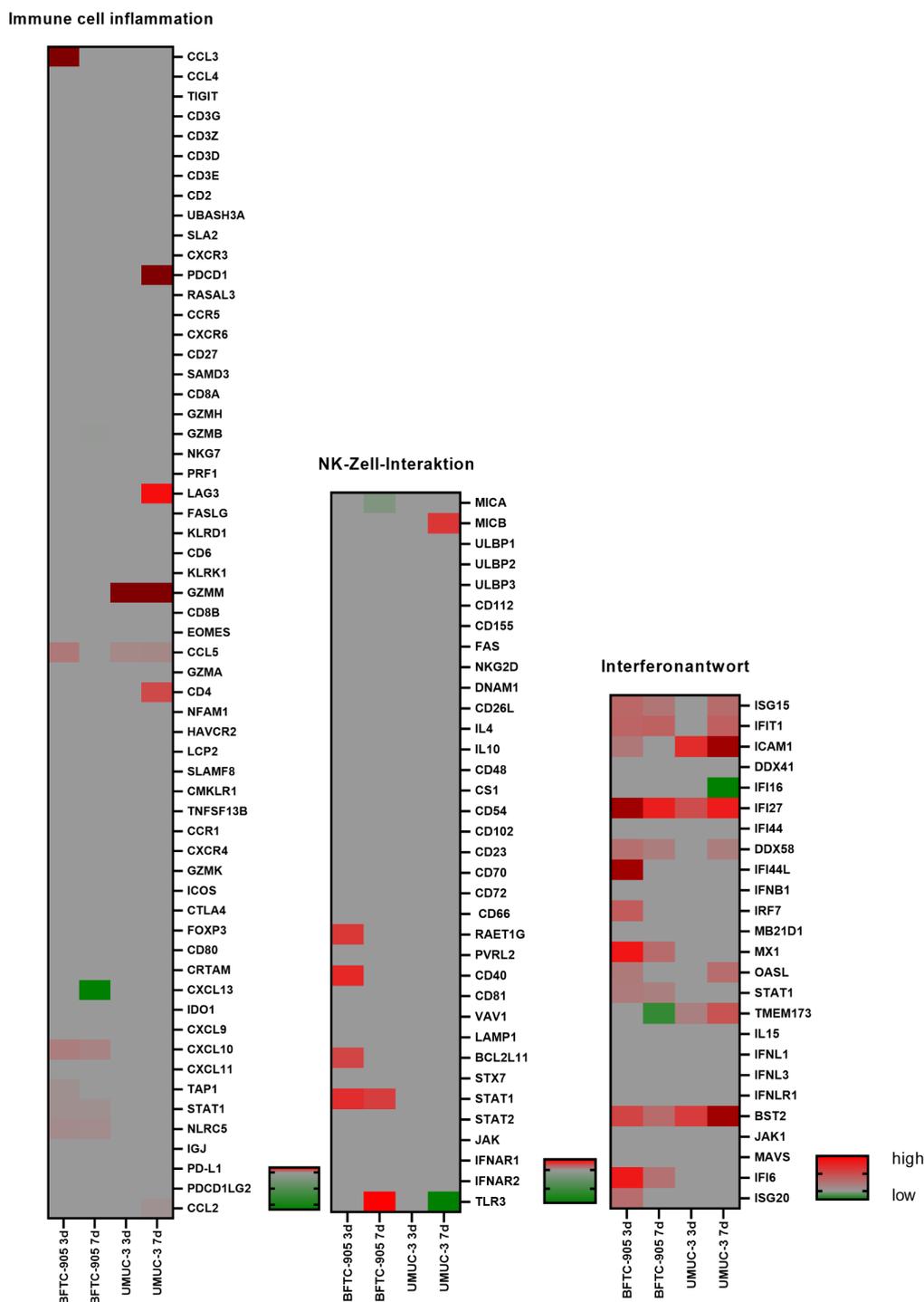
**Abbildung 4.38:** Heat-Map aus RNA-Sequenzierungsdaten der Zelllinien BFTC-905 und UMUC-3 drei und sieben Tage nach Decitabine-Behandlung. Eine vermehrte Genexpression wird rot dargestellt (je dunkler desto höher die Expression), eine verminderte Expression erscheint grün. Graue Kästchen weisen keine veränderte Genexpression durch Decitabine-Behandlung auf. Farblich gekennzeichnet sind nur Gene mit Fold Change  $\geq 1,5$  und  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  nach Bonferoni Korrektur.

Für die adaptive Immunität ist die Präsentation von Antigenen (*Antigen Processing*) relevant. Für die Antigenpräsentation werden Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) benötigt, um den  $CD4+$  oder den  $CD8+$  T-Zellen antigene Peptide zu präsentieren. Die Präsentation von MHC/Antigen-Komplexen zusammen mit kostimulatorischen Molekülen und der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen lösen dann eine angemessene Immunantwort aus. [51]

Durch die Behandlung mit Decitabine konnte für das Antigenprocessing in UMUC-3 vor allem die Expression von *CTSF* (*Cathepsin F*) und *IFI30* (*IFI30 Lysosomal Thiol Reductase*) sowie *CTSV* (*Cathepsin V*) in BFTC-905 gesteigert werden.

DNMTi können dazu beitragen den viralen Immunabwehrweg zu induzieren, wobei es zur Signalwegaktivierung von endogenen Retroviren (ERVs) kommen kann. [52] Eine Aktivierung dieses Signalwegs beweist die vermehrte Expression von *IFI27*, *IFI44L* (*Interferon Induced Protein 44 Like*), *MX1* (*MX Dynamin Like GTPase 1*) und *IFI6* (*Interferon Alpha Inducible Protein 6*) in BFTC-905 nach Decitabine-Behandlung. Vor allem *IFI27* wies hierbei eine besonders starke Expression auf und war auch in der Zelllinie UMUC-3 nach Behandlung vermehrt exprimiert.

Bezüglich der Chemokin-Expression bewirkte die Behandlung mit Decitabine ein erhöhtes Vorkommen von *CCL5* in beiden dargestellten UC-Zelllinien sowie von *CXCL10* in der Zelllinie BFTC-905 nach Behandlung mit Decitabine.



**Abbildung 4.39: Heat-Map aus RNA-Sequenzierungsdaten der Zelllinien BFTC-905 und UMUC-3 drei und sieben Tage nach Decitabine-Behandlung. Eine vermehrte Genexpression wird rot dargestellt (je dunkler desto höher die Expression), eine verminderte Expression erscheint grün. Graue Kästchen weisen keine veränderte Genexpression durch Decitabine-Behandlung auf. Farblich gekennzeichnet sind nur Gene mit Fold Change  $\geq 1,5$  und  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  nach Bonferoni Korrektur.**

Eine Möglichkeit zur besseren Erkennung des Tumors durch Auslösen einer Immunreaktion in Form einer Inflammation/Entzündung (Immune cell Inflammation), könnte durch die stark vermehrte Expression von *CCL3* und *CCL5* in BFTC-905

drei Tage nach Behandlung mit Decitabine ermöglicht werden. In UMUC-3 hoben sich *PDCD1* (*Programmed Cell Death 1*) und *GZMM* (*Granzyme M*) durch eine vermehrte Expression nach Behandlung mit Decitabine ab. Zusammenfassend scheint die Behandlung mit Decitabine weniger zu einer Steigerung der Inflamationsreaktion beizutragen.

Natürliche Killerzellen sind ein wichtiger Bestandteil des Immunoeditings. Durch Exozytose zytotoxischer Granula oder durch die Produktion von Interferon  $\gamma$  zur Aktivierung von Makrophagen oder T-Helferzellen können sie Tumore eliminieren [53] und sind daher auch ein wichtiger Bestandteil dieser Arbeit. Gene für die Interaktion mit natürlichen Killerzellen wurden nach Behandlung mit Decitabine besonders in BFTC-905 und weniger in UMUC-3 vermehrt exprimiert. Diesbezüglich fiel eine vermehrte Expression von *RAET1G* (*Retinoic Acid Early Transcript 1G*), *CD40* nach drei Behandlungstagen mit Decitabine in BFTC-905 auf sowie von *STAT1* nach sieben Tagen. Der *TLR3* wurde unabhängig vom Messzeitpunkt in BFTC-905 deutlich vermehrt exprimiert. In UMUC-3 fiel vor allem ein vermehrter Nachweis von *MICB* sieben Tage nach Behandlung mit Decitabine auf.

Im Vergleich trug die Behandlung mit Decitabine weniger zu einer gesteigerten NK-Zell-Interaktion oder Immunzellinflammation bei, jedoch lässt die Behandlung mit Decitabine auf eine deutlich vermehrte Interferonantwort schließen. Dies zeigte sich insbesondere durch eine ausgeprägte Hochregulation von *IFI44L* und *IFI6* in BFTC-905 sowie *ICAM-1* in UMUC-3 und *IFI27* und *BST2* (*Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2*) in beiden UC-Zelllinien.

Zusammenfassend wirkte sich die Behandlung von Decitabine unterschiedlich und teilweise auch abhängig vom Messzeitpunkt auf die Genexpression auf. Dennoch war ein Effekt der Decitabine-Behandlung auf die Genexpression immunmodulierender Faktoren deutlich erkennbar, denn es wurden nach der Behandlung mit Decitabine vermehrt Gene exprimiert, die mit einer Virus- oder Interferonantwort assoziiert sind. Ebenso führte die Behandlung zur vermehrten Signalwegaktivierung von *ERVs* (*Endogenous Retroviruses*).

## 5 Diskussion

### 5.1 Wirkung der epigenetischen Inhibitoren auf die T-Zellinteraktion

#### 5.1.1 Wirkung auf kostimulatorische Faktoren

Ein Hauptziel dieser Arbeit war zu prüfen ob epigenetische Inhibitoren die Interaktion zwischen Tumorzellen und T-Zellen beeinflussen können indem sie das Niveau von Interaktionsmolekülen verändern. Daher wurden mit FAS-R (CD95/FAS) und ICAM-1 zunächst zwei Faktoren betrachtet, die die Zellinteraktion positiv vermitteln.

Die Behandlung mit dem HDACi Romidepsin zeigte lediglich in zwei UC-Zelllinien ein erhöhtes Proteinniveau für den FAS-Rezeptor. Durch die Interaktion zwischen dem FAS-Liganden von T-Zellen und dem FAS-Rezeptor auf Tumorzellen können T-Zellen Apoptose in den Tumorzellen induzieren. [33] Nach Behandlung mit dem DNMTi Decitabine war das Proteinniveau für den FAS-Rezeptor ebenfalls in BFTC-905 und einer anderen UC-Zelllinie sowie der Kontrollzelllinie HBLAK erhöht. In zwei UC-Zelllinien führt die Behandlung mit Decitabine zu einem verminderten Proteinniveau des FAS-Rezeptors. Nach Romidepsin-Behandlung wurde der FAS-Rezeptor in einer UC-Zelllinie und der Kontrollzelllinie vermindert nachgewiesen. Diese teils entgegengesetzten Auswirkungen der Behandlung mit *Epidrugs* auf die verschiedenen Zelllinien unterstreichen nochmal die Heterogenität des Urothelkarzinoms. Insgesamt lassen die Ergebnisse jedoch auf einen etwas stärkeren Einfluss der Behandlung mit Decitabine auf die FAS-Expression schließen. Eine geringere Steigerung des Grundniveaus von CD95 kann dem bereits erhöhten Grundniveau für CD95 über alle UC-Zelllinien hinweg vor Behandlung zugrunde liegen.

Eine signifikant vermehrte Expression des Zelltodrezeptors FAS konnte nach Decitabine-Behandlung auch in Glioblastomzellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, wobei Glioblastome ebenfalls eine sehr heterogene Tumorentität darstellen. Auch der durch eine rekombinante FASL-Verbindung vermittelte Zelltod wurde verstärkt. Zudem sensibilisierte Decitabine Gliomzellen für eine Elimination durch zytotoxische CD8 T-Zellen. [54] In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass der HDACi Depsipeptid die tumorspezifische T-Zellvermittelte Abtötung von B16/F10-Mausmelanomzellen fördert. Eine subletale Dosis von Depsipeptid verstärkte in Verbindung mit einem rekombinanten Fas-Liganden oder tumorspezifischen T-Zellen synergistisch den apoptotischen Zelltod in Mausmelanomzellen in vitro. [55]

Im Urothelkarzinom konnte eine Hypermethylierung des CD95-Promotors nachgewiesen werden, [56] was dafür spricht, dass die Expression von CD95 über DNA-Methylierung reguliert wird und DNMTi als therapeutischer Ansatz durchaus geeignet sein können. Zudem würde dies eine Erklärung dafür liefern, dass die

Behandlung mit Decitabine einen stärkeren Einfluss auf das Proteinniveau des FAS-Rezeptors hatte als die Behandlung mit Romidepsin. Außerdem wurde nachgewiesen, dass das Proteinniveau von FAS im Urothelkarzinom signifikant niedriger war als im normalen Blasengewebe [56]. Ließe sich diese also durch Behandlung mit *Epidrugs* wieder steigern, so könnte eine bessere Eliminierung von Tumorzellen durch Immunzellen erreicht werden.

Es zeigte sich außerdem ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus des *FAS*-Gens und einem erhöhten Risiko für Plattenepithalkarzinome der Mundhöhle, welche wie beim Urothelkarzinom ebenfalls eine Hypermethylierung von *FAS* aufweisen. [57] Daraus lässt sich ableiten, dass hypomethylierende Substanzen wie Decitabine sowohl für UC als auch HNSCC einen positiven Effekt auf die T-Zellinteraktion haben könnten und somit zu einem verbesserten Ansprechen von Immuntherapien beitragen könnten.

Durch die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 auf der Zelloberfläche von Endothel-, Epithel- und Immunzellen werden zum Beispiel bei Entzündungsreaktionen Leukozyten aus dem Blutkreislauf zu Entzündungsherden rekrutiert. [32] Zudem ist ICAM-1 auch für weitere Immunfunktionen wie die T-Zell-Aktivierung verantwortlich. Hierbei spielen epigenetische Modifikationen eine entscheidende Rolle. [58] Die Expression von ICAM-1 auf malignen Zellen (wie z. B. Leukämiezellen und anderen Karzinomen) reguliert die Interaktion von CAR-T-Zellen mit ihren Zielzellen. Mehreren Studien zufolge bildet ICAM-1 eine synaptische Verbindung zwischen T-Zellen und Zielzellen oder zwischen CD19-CAR-T-Zellen und malignen B-Zellen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie. Entsprechend kann ICAM-1 für das Eindringen von CAR-T-Zellen in Tumorzellen für eine Verbesserung der CAR-T-Zelltherapie bei soliden Tumoren von hoher Bedeutung sein. [59]

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 zeigte über alle UC-Zelllinien hinweg besonders nach Decitabine-Behandlung ein erhöhtes Proteinniveau. Auch für die Behandlung mit dem HDACi Romidepsin ließ sich dieser Effekt für fast alle UC-Zelllinien nachweisen. In den RNA-Sequenzierungsdaten fiel nach Behandlung mit Decitabine in beiden verwendeten UC-Zelllinien ebenfalls ein deutlich erhöhtes Proteinniveau für ICAM-1 auf. Dieser Effekt stimmt mit den FACS-Analysen überein und bestätigt die positive Auswirkung der Decitabine-Behandlung auf UC-Zellen. Auch in der für die RNA-Sequenzierung ausgewählten HNSCC-Zelllinie UT-33 wurde ICAM-1 nach Behandlung mit Decitabine vermehrt exprimiert. Dies lässt darauf schließen, dass sowohl Romidepsin als auch Decitabine durch die Hochregulation von ICAM-1 sowohl im Urothelkarzinom als auch in Kopf- und Halstumoren zu einem besseren Eliminieren von Tumorzellen durch T-Zellen führen kann. Letztendlich sind weitere Untersuchungen der HNSCC-Zelllinien notwendig, da aufgrund der Heterogenität von HNSCC bei der Auswirkung der Behandlung auf eine Zelllinie noch nicht von einer allgemeinen Wirkung auf alle HNSCC gesprochen werden kann. Bei UC-Zelllinien konnte trotz Heterogenität ein eindeutiger Effekt über alle Zelllinien hinweg nachgewiesen werden.

Ein ähnlicher Effekt der Decitabine-Behandlung wurde auch bei Glioblastomzellen entdeckt. MHCI und ICAM-1 wurden via Durchflusszytometrie untersucht und konnten durch die Behandlung mit Decitabine deutlich hochreguliert werden. Anschließend wurde via *Killing Assay* eine verstärkte Abtötung von Tumorzellen durch T-Zellen nachgewiesen. Insgesamt wurde gezeigt, dass hypomethylierende Substanzen die Erkennung von Gliomzellen - unabhängig von ihrem Differenzierungsstatus - und ihre anschließende Zerstörung durch Immunzellen verbessern können. [54] Diese Ergebnisse verstärken die Annahme, dass eine Vorbehandlung mit epigenetischen Inhibitoren wie DNMTi und HDACi auch bei heterogenen Tumoren das Ansprechen auf eine Immuntherapie deutlich verbessern könnten.

Eine vermehrte Expression von ICAM-1 konnte bei Patienten mit Harnblasenkarzinom sowohl im Serum als auch im Urin im Vergleich zu einer Kontrollgruppe gesunder Probanden nachgewiesen werden. [60]

Mit der Induktion einer ICAM-1 Expression in Urothelkarzinomzellen kann auf eine Umkehr von Immune-Escape-Strategien solider Tumoren geschlossen werden [61], weshalb Substanzen, die zu einer gesteigerten ICAM-1 Expression führen auch als Adjuvanz einer modernen Checkpoint-Inhibition sinnvoll eingesetzt werden könnten.

In anderen Untersuchungen wurde eine angiostatische Wirkung von DNMTi und HDACi beobachtet. Es konnte durch eine Behandlung mit dem DNMTi Decitabine und dem HDACi Trichostatin A ebenfalls eine Reexpression von ICAM-1 auf tumorkonditionierten Endothelzellen *in vitro* nachgewiesen werden. Dies konnte später auch durch die Behandlung von Tumorendothelzellen aus zwei verschiedenen Mäusetumormodellen *in vivo* belegt werden. Außerdem wurde die Interaktion zwischen Leukozyten und Gefäßwänden in Mäusetumoren durch HDACi und DNMTi verstärkt, woraus eine vermehrte Infiltration von Leukozyten resultierte. Letztendlich konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 in Tumorendothelzellen durch Histonmodifikation stummgelegt wurde und dieser Mechanismus durch DNMTi und HDACi reversibel war. [62]

Andere Daten weisen darauf hin, dass das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 an der Entstehung einer Immunreaktion gegen HNSCC beteiligt sein könnte, da dies konstitutiv auf HNSCC-Zelllinien exprimiert wird. Eine Behandlung mit Interferon- $\gamma$  und anderen Zytokinen verstärkte die Expression. [63] Möglicherweise induziert die Behandlung mit *Epidrugs* ICAM-1 somit auch durch eine vermehrte Aktivierung und Induktion von Zytokinen und Interferonen in UC und HNSCC und steigert somit indirekt die T-Zellinteraktion.

### 5.1.2 Wirkung auf koinhibitorische Faktoren

PD-L1 und PD-L2 wurden als koinhibitorische Marker für eine Interaktion von Tumor- und T-Zellen ausgewählt, da eine Bindung von PD-1 an den Liganden PD-L1 oder PD-L2 auf der Tumorzelle eine T-Zelldeaktivierung bewirkt. [31] Unter-

suchungen zeigten, dass PD-1 und PD-L1 im Gewebe des muskelinvasivem Blasenkarzinoms überexprimiert werden, wohingegen im nicht-muskelinvasiven Blasenkarzinom sowie im normalen Urothel keine verstärkte Expression nachweisbar ist. [64]

Um die T-Zellaktivierung und damit den Tumor *immune escape* zu begrenzen werden daher therapeutische Antikörper gegen solche Immuncheckpointmoleküle in der Therapie des UC und des HNSCC verabreicht. [14, 65] Allerdings gibt es Anzeichen, dass der prädiktive Nutzen von PD-L1 allein für die Immuncheckpointblockade beim fortgeschrittenen UC unzureichend sein könnte. Hierbei stellt die Heterogenität innerhalb des Tumors und Veränderungen der Expression von PD-L1 eine der größten Herausforderungen dar. [66] Andere Arbeiten belegen, dass PD-L1 in HNSCC-Zellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle in der Tumormikroumgebung sowie als Mechanismus zur Umgehung des Immunsystems darstellt. Es werden bereits mehrere Medikamente, die auf PD-1 oder PD-L1 abzielen, untersucht oder sind bereits für die klinische Anwendung bei HNSCC zugelassen. [67]

In dieser Arbeit sollte untersucht werden wie sich *Epidrugs* auf das Niveau von PD-L1 und PD-L2 auswirken. Aus den FACS-Analysen resultierte ein insgesamt eher gesteigertes Proteinniveau von PD-L1 und PD-L2 auf den UC-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK nach Behandlung mit Romidepsin und Decitabine, wobei die Behandlung mit Romidepsin insgesamt stärkere Effekte auf das Proteinniveau der beiden Liganden aufwies. Vor Behandlung mit den epigenetischen Inhibitoren zeigte sich für PD-L1 ein sehr unterschiedliches Grundniveau der UC-Zelllinien, welches durch die Heterogenität des Urothelkarzinoms begründet werden kann. Für PD-L2 fiel ein sehr niedriges Grundniveau vor der Behandlung mit *Epidrugs* auf. In den HNSCC bildete sich das Grundniveau von PD-L1 wie in den UC-Zelllinien sehr heterogen ab, während das Grundniveau für PD-L2 ebenfalls niedrig war. Eine Steigerung der Proteinexpression für PD-L1 und PD-L2 konnte in HNSCC sowie in den UC-Zelllinien sowohl durch Romidepsin als auch durch Decitabine erzielt werden. Diesbezüglich weisen beide Tumorentitäten ein ähnliches Expressionsmuster koinhibitorsicherer T-Zellinteraktion auf und reagieren ähnlich auf die epigenetische Behandlung mit DNMTi und HDACi. Somit ist wahrscheinlich, dass *epidrugs* die Wirkung der Immuncheckpoint-Therapie beeinflussen könnten.

## 5.2 Wirkung der Inhibitoren auf die NK-Zellinteraktion

NK-Zellen stellen als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine essentielle Rolle bei der Immunabwehr von Tumoren dar. Vor allem bei der Stärke einer Tumorabwehrreaktion spielt der aktivierende Immunrezeptor NKG2D (Natural Killer Group 2, Member D) und seine Liganden eine wichtige Rolle. Entsprechend ist die Expression von NKG2D-Liganden wie ULBP-3 und die Ketten A und B des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I (MICA bzw. MICB) auf den Tumorzellen ein entscheidender Faktor für eine wirksame Immunüberwachung und

Eliminierung von Tumorzellen und erweist sich so als potenzielles therapeutisches Ziel zur Verbesserung der Immunantwort. [35]

Insgesamt wirkte sich die Behandlung mit Decitabine jedoch wenig auf das Proteinniveau von ULBP-3 aus, während die Romidepsin-Behandlung zu einem gesteigertem Proteinniveau über fast allen UC-Zelllinien führte. Offenbar wird dieses Molekül in UCC stärker über Histonacetylierung als DNA-methylierung reguliert. Es lässt sich also darauf schließen, dass durch die Vorbehandlung mit Romidepsin ULBP-3 als NKG2D-Ligand vermehrt von der Tumorzelle exprimiert wird und somit zu einer verstärkten Interaktion mit NK-Zellen führen kann. Die Behandlung mit Decitabine hatte keine relevante Auswirkung auf das Proteinniveau von ULBP-3. Allerdings konnten die RNA-Sequenzierungsdaten ein erhöhtes Expressionsniveau von MICB in der untersuchten UC-Zelllinie UMUC-3 nach Behandlung mit Decitabine nachweisen. Demzufolge scheint Decitabine auch einen positiven Einfluss auf die NK-Zellinteraktion zu haben.

Zudem wiesen andere Untersuchungen ebenfalls nach, dass die Interaktion zwischen NKG2D und seinen Liganden MICA und MICB eine relevante Rolle bei der Lyse verschiedener Karzinomzellen durch aktivierte NK-Zellen spielt. [68] In einer weiteren Arbeit wurden die NKG2D-Liganden MICA, MICB und ULBP1-3 via FACS-Analyse untersucht. Hier zeigte sich nach Niedrig-Dosis-Decitabine-Langzeitbehandlung von Leukämiezellen ebenfalls eine vermehrte Expression von NKG2D-Liganden, während sich nach einer kürzeren Zeitspanne von 24h noch kein Effekt nachweisen ließ. Dabei soll Decitabine die NK-Zellen nicht direkt stimulieren, sondern vielmehr die Reaktionsfähigkeit der NK-Zellen auf eine nachfolgende Stimulation erhöhen. Zudem wirkt sich die Behandlung mit Decitabine auf unterschiedliche Gene aus, die an der Zytotoxizität und der IFN- $\gamma$ -Produktion sowie der Freisetzung aktivierender Zytokine beteiligt sind. [69] Eine Freisetzung weiterer immun-aktivierender Zytokine kann für die Behandlung mit Immuncheckpoint-Inhibitoren von Vorteil sein, da so weitere Immunkomponenten rekrutiert werden und zu einem besseren Greifen der Therapie beitragen könnten.

Durch Decitabine wird die NK-Zytotoxizität sowie die IFN-Produktion auch in hämatopoetischen Tumoren signifikant verstärkt. Zudem induziert Decitabine die Transkription von Genen, die eine Reaktivität der NK-Zellen positiv beeinflusst. Da die meisten Therapien vor allem gegen hämatopoetische Malignome auf eine verstärkte NK-Reaktivität abzielen, eignet sich Decitabine im Vergleich zu anderen DNMTis wie hier Azacytidin eher zur Behandlung von hämatopoetischen Tumoren. Durch Decitabine kann eine kombinierte Wirkung gegen bösartige Zellen sowie eine gleichzeitige Verbesserung der Funktion von NK-Zellen erreicht werden. [69] Die Anwendbarkeit auf solide Tumoren wie UC und HNSCC muss noch weiter erforscht werden, jedoch zeigen sich bisher deutlich positive Auswirkungen der Behandlung mit HDACi und DNMTi, sodass durch die Induktion von NKG2D-Liganden von einer verbesserten Interaktion von Tumor- und NK-Zellen ausgegangen werden kann. Dies kann auch dazu beitragen den Tumor *immune escape* zu überwinden und ein besseres Ansprechen von Therapien z.B. mit Immuncheckpointinhibitoren zu bewirken. Insgesamt liegen jedoch mehr Daten

zur Auswirkung der Decitabine-Behandlung auf die NK-Zellinteraktion vor als für Romidepsin. Demzufolge sind weitere Forschungen der Auswirkungen von Romidepsin auf die NK-Zellinteraktion notwendig. Tendenziell zeigte sich jedoch ein deutlich positiver Effekt auf die Interaktion von NKD2D-Liganden.

### 5.3 Wirkung der Inhibitoren auf die Chemokinexpression

Nicht nur die Immunzellen alleine sind für eine anti- oder protumorale Reaktion verantwortlich, da sie ihre Funktion auch durch die Sekretion von Zytokinen entfalten. Tumor- und Endothelzellen sind ebenfalls dazu in der Lage Zytokine freizusetzen. Damit sind Zytokine wesentlich an der Interaktion und Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen beteiligt. Einerseits können Zytokine an der Kontrolle und Reparatur von Gewebsschäden mitwirken, andererseits können sie auch die Tumormikroumgebung modulieren und somit das Überleben und die Proliferation von Tumorzellen sowie die Immunsuppression fördern. Zytokine spielen entweder eine antitumorale Rolle, indem sie Immunzellen wie CD8+ T-Zellen, T-Helferzellen und NK-Zellen rekrutieren oder eine pro-tumorale Rolle, indem sie beispielsweise tumorassoziierte Neutrophile und Tumor-assoziierte Makrophagen rekrutieren, die das Tumormikromilieu im Sinne von Tumorzellen günstig modulieren können. Damit stellen Zytokine einen nicht zu unterschätzenden Faktor in der Tumoringenese, dem Wachstum, der Progression und der Metastasenbildung von Tumoren dar. [70] CXCR3 ist beispielsweise ein Chemokinrezeptor, der durch die IFN- $\gamma$ -induzierbaren Liganden CXCL9, CXCL10 und CXCL11 aktiviert werden kann. Es konnte nachgewiesen werden, dass der CXCR3-Signalweg zu einer Aktivierung von Anti-Tumor Effektor T-Zellen und anderen Immunzellen wie NK-Zellen führen kann. Somit könnte ein „kalter“ Tumor in einen „heißen“ Tumor verwandelt werden, woraus eine bessere Erkennung und Eliminierung des Tumors durch Immunzellen resultieren kann. Somit wäre denkbar, dass die CXCR3-Achse die Wirksamkeit von Tumorimmuntherapie positiv beeinflussen könnte. [71] Als CXCR3 Liganden wurden für diese Arbeit CXCL10 und CXCL11 näher untersucht.

Die Auswirkungen der Behandlung mit Romidepsin und Decitabine auf die Genexpression der Chemokine *CCL2*, *CCL5*, *CXCL10* sowie *CXCL11* auf Tumorzellen zeigen unterschiedliche Ergebnisse. Für *CCL2* fiel lediglich in einer UC-Zelllinie nach Romidepsin-Behandlung sowie in einer Zelllinie nach Behandlung mit Decitabine ein erhöhtes Proteinniveau auf. In einer Zelllinie zeigte sich nach Behandlung mit Decitabine eine verminderte Expression von *CCL2*. Ansonsten ließ sich diesbezüglich kein deutlicher Effekt nachweisen.

Andere Arbeiten ergaben, dass *CCL2* die Infiltration und Migration verschiedener Immunzellen reguliert und damit zur Tumorprogression und Metastasenbildung beitragen kann. Eine erhöhte *CCL2*-Konzentration konnte hier vor allem in Cisplatin-resistenten Zelllinien sowie in höhergradigen Blasen Tumoren nachgewie-

sen werden. [70] Demzufolge könnte eine Unterdrückung von *CCL2* einen positivere Auswirkung auf eine Anti-Tumor-Antwort des Immunsystems haben als die Steigerung. Insgesamt wurde nur in wenigen Zelllinien überhaupt unabhängig von der Behandlung *CCL2* exprimiert.

Ein erhöhtes Proteinniveau für *CCL5* fiel in vier Zelllinien nach Decitabine-Behandlung und nur in einer UC-Zelllinie nach Behandlung mit Romidepsin auf.

Im kolorektalen Karzinom spielt *CCL5* eine duale Rolle abhängig davon, welche Zellen *CCL5* freisetzen. Einerseits rekrutiert *CCL5* Immunzellen, um das Immunsystems bei der Antitumorantwort zu unterstützen und andererseits kann *CCL5* auch immunsuppressive Zellen in die Tumormikroumgebung rekrutieren, um das Tumorwachstum zu unterstützen. [72] In einer anderen Arbeit förderte *CCL5* im Blasenkarzinom die Proliferation, Migration und das Tumorwachstum *in vitro* und die Metastasierung von Blasenkarzinomzellen auch *in vivo*. Zudem konnte festgestellt werden, dass die tumorfördernde Rolle von *CCL5* im Zusammenhang mit der Aktivierung des *JAK2/STAT3*-Signalwegs steht. [73] Die *CCL5/CCR5*-Achse wird ebenfalls mit der Tumorprogression verbunden. Jedoch kann *CCL5* durch das Rekrutieren von Anti-Tumor-T-Zellen und dendritischen Zellen in die Tumormikroumgebung die Wirkung von Immuntherapien bei verschiedenen Tumorarten verstärken. [74] Letztendlich wird *CCL5* in UC-Zelllinien deutlich mehr durch Decitabine induziert und nach Romidepsin-Behandlung eher vermindert exprimiert. Geht man nun von einem verbesserten Ansprechen durch die Rekrutierung von Immunzellen aus, so kann eine Vorbehandlung mit Decitabine eher zu einem verbesserten Ansprechen von Immuntherapien führen. Geht man allerdings davon aus, dass die Expression von *CCL5* durch das Anlocken von immunsupprimierenden Zellen zu einer Tumorprogression beiträgt, so wäre eine verminderte Expression wie durch Romidepsin-Behandlung wünschenswert. Die genaueren Auswirkungen müssten also zukünftig im Detail untersucht werden.

Beim Mundhöhlenkarzinom wurde eine Hemmung der *CCR5/CCL5*-Achse als vielversprechende neue Therapiealternative dargestellt, da die Expression von *CCR5* mit dem klinischen Stadium und der Metastasierung assoziiert wurde und *CCL5* im Zusammenhang mit dem Gesamtüberleben stand. [75] Geht man davon aus, dass die Expression von *CCL5* in HNSCC mit einer schlechten Prognose assoziiert ist, so scheint hier die Behandlung mit Romidepsin als möglicher Therapieansatz sinnvoll, da sich zumindest für UC-Zelllinien als solide Tumorentität eine eher verminderte Expression von *CCL5* zeigt. Die Behandlung mit Decitabine führte in der RNA-Sequenzierung zu einer vermehrten Genexpression von *CCL5* in der HNSCC-Zelllinie UT-33. Letztendlich müssten weitere Auswirkungen der Behandlung mit Romidepsin auf die Expression von *CCL5* in HNSCC untersucht werden, um dies als therapeutisches Ziel werten zu können.

Für *CXCL10* und *CXCL11* fielen oft entgegengesetzte Effekte von Romidepsin und Decitabine auf. In zwei UC-Zelllinien und der Kontrollzelllinie HBLAK bewirkte die Decitabine-Behandlung eine leichte Erhöhung des Proteinniveaus, während die Behandlung mit Romidepsin ein niedrigeres Niveau im Vergleich zur

DMSO-Kontrolle darlegt. Hier zeigt sich durch Decitabine-Behandlung wieder eine induzierende Wirkung von *CXCL10* und *CXCL11* und durch Romidepsin-Behandlung ein reduzierender Effekt.

Weitere Untersuchungen deuten darauf hin, dass *CXCL10* ein Marker für eine gute antitumorale Immunreaktion nach einer BCG-Therapie von Urothelkarzinomen sein könnte. Ein Überschuss dieses Faktors könnte allerdings auch auf eine übermäßige Entzündungsreaktion hinweisen, die zu Beschwerden der Patienten (z.B. einer Zystitis) führen kann. Es wurde gezeigt, dass mit BCG behandelte T- und NK-Zellen *CXCR3*, den Rezeptor für *CXCL10*, hochregulieren und effizienter zu *CXCL10* wandern. [76]

Andere Arbeiten zeigten jedoch, dass eine vermehrte Expression von *CXCL10* und eine Koexpression von *CXCR3* mit einem erhöhten Potenzial zur Metastasierung einhergehen könnte. Da der autokrine *CXCL10/CXCR3*-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Förderung von Wachstum und Metastasierung von Tumorzellen spielt, war die Koexpression von *CXCL10* und *CXCR3* mit einer frühen Tumorprogression und einem schlechteren Gesamtüberleben in Melanom-, Colon- und Nierenzellkarzinomzellen assoziiert. [77] Diesbezüglich wären weitere Versuchsreihen mit UC-Zelllinien zum Einfluss der Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren und der Koexpression von *CXCL10* und *CXCR3* interessant, um diesen Effekt nachzuweisen oder zu widerlegen.

Insgesamt fiel auf, dass die Decitabine-Behandlung im Vergleich zur Behandlung mit Romidepsin zu einer vermehrten Induktion der untersuchten Chemokine führte. Dieser Effekt lässt sich durch die RNA-Sequenzierungsdaten belegen, in denen ebenfalls eine verstärkte Expression von *CCL2*, *CCL5* und *CXCL10* auffiel. Weitere Arbeiten zeigten, dass die durch Decitabine induzierte Zytokinsekretion die T-Zell-Aktivierung mäßig verbessern, die T-Zell-Migration jedoch deutlich steigern konnte. [78] Die Wirkung von epigenetischen Inhibitoren auf Zytokine könnte also die Immuntherapie beeinflussen, jedoch sind weitere Untersuchungen dazu notwendig, um verschiedene Koexpressionsmuster weiter zu erfassen und in Zusammenhang bringen zu können.

#### **5.4 Auswirkungen der Inhibitoren auf den *Viral Mimicry* Signalweg**

Die Behandlung mit epigenetischen Inhibitoren soll auch dazu beitragen, dass der *Viral Mimicry* Signalweg vermehrt aktiviert wird, um zu einer besseren Erkennung der Tumorzellen durch das Immunsystem beizutragen und eine natürliche Abwehrreaktion von Tumorzellen hervorzurufen. Hierzu wurden *STAT1*, *IFI44* und *OASL* als Endprodukte des *Viral Mimicry* Signalwegs näher untersucht. Via PCR ließ sich lediglich in einer UC-Zelllinie (SW1710) eine starke Induktion von *OASL* und *IFI44* nach Behandlung mit Decitabine nachweisen. Auf die übrigen verwendeten UC-Zelllinien zeigte die Behandlung mit Decitabine eine verhältnismäßig geringe Auswirkung. Die Behandlung mit Romidepsin führte eher zu einem verminderten Genexpression von *OASL*, *IFI44* und *STAT1*. Entsprechend

liegt nahe, dass die Behandlung mit Romidepsin eher keine Immunabwehrreaktion im Sinne eines *Viral Mimicry* Signalwegs hervorruft. In den RNA-Sequenzierungsdaten lassen sich jedoch weitere positive Effekte durch die Decitabine-Behandlung nachweisen. Hier zeigte sich eine vermehrte Genexpression von *OASL* in UMUC-3 und BFTC-905 und *STAT1* in BFTC-905. Für die RNA-Sequenzierung wurden lediglich diese zwei UC-Zelllinien untersucht, sodass die Heterogenität des Urothelkarzinoms nicht vollständig abgebildet ist. Auch in der untersuchten HNSCC-Zelllinie (UT-33) wurde *OASL* durch Behandlung mit Decitabine induziert. Dennoch lässt eine tendentielle Wirkung der Decitabine-Behandlung auf eine vermehrte Induktion des *Viral Mimicry* Signalwegs schließen. Auch die Heat-Maps zeigen eine stärkere Auswirkung der Behandlung mit Decitabine auf die Virusabwehr und *ERV-Signature* sowie eine deutlich gesteigerte Interferonantwort. Durch Decitabine-Behandlung ist insbesondere die Genexpression von *IFI27* auffällig stark erhöht gewesen.

Arbeiten mit Kolonkarzinom-Zelllinien haben ebenfalls gezeigt, dass Decitabine den IFN-Signalweg aktiviert, sodass eine Vorbehandlung mit dem DNMTi menschliche Kolonkarzinomzelllinien für eine anschließende IFN-Behandlung sensibilisieren kann. [79]

Aus Untersuchungen von Fibroblasten und Harnblasenkarzinomzellen resultierte eine starke Induktion von Genen in den IFN-Signalwegen wie *STAT1*, *SAA1*, *KRT17* sowie anderen nachgeschalteten Genen nach Decitabine-Behandlung. Über welche Mechanismen Decitabine die IFN-Signalwege aktiviert, ist noch nicht geklärt. Zu den wichtigsten durch IFN induzierten Funktionen zählen jedoch antivirale Aktivitäten sowie die Hemmung des Zellwachstums, der Apoptosekontrolle sowie der Aktivierung des Immunsystems. Die Demethylierung von endogenen Retrotransposons durch Decitabine kann zu deren Transkription führen und durch nachgeschaltete Mechanismen möglicherweise auch den IFN-Signalweg aktivieren. [80]

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem DNMTi Azacytidin eine Interferonantwort induziert, indem sich eine vermehrte Expression von ISGs wie *IFI27* und *IFI44* sieben Tage nach Behandlung nachweisen ließ. [52] Auch im Mundhöhlenkarzinom konnte immunhistochemisch eine starke Expression von *IFI27* festgestellt werden, welche jedoch mit dem Fortschreiten des Tumors und verminderter Apoptose in Zusammenhang gebracht wird. Eine Reduktion von *IFI27* wirkte sich durch eine verminderten Zellproliferation und vermehrten Apoptose eher positiv auf Mundhöhlenkarzinomzellen aus. [81] Auch im hepatozellulären Karzinom und Magenkarzinom wirkt das Herunterregulieren von *IFI27* in Tier- und Zellmodellen pro-apoptotisch, sodass *IFI27* hier als Schlüsselprotein für die Tumorentwicklung gesehen wird. Im Pankreaskarzinom wird eine hohe Expression von *IFI27* ebenfalls mit einer schlechten Überlebensrate assoziiert. [82]

Letztendlich scheint *IFI27* als teils positiver und teils negativer prognostischer Marker gewertet zu werden. Einerseits kann *IFI27* Ausdruck einer verbesserten

Interferonantwort sein, in anderen Tumorentitäten wurde eine vermehrte Expression von *IFI27* jedoch mit einer schlechteren Prognose und Apoptoseunterdrückung in Verbindung gebracht. Möglicherweise wirkt sich *IFI27* auf verschiedene Tumorentitäten unterschiedlich aus oder kann über unterschiedliche Signalwege pro- und anti-apoptotische wirken. Dies gilt es in weiteren Versuchen zu klären.

Im menschlichen Genom sind Elemente endogener Retroviren (ERVs) integriert. Studien haben gezeigt, dass eine dysregulierte ERV-Transkription mit der Infiltration von Immunzellen bei Tumorerkrankungen einhergeht. Die meisten ERVs sind epigenetisch unterdrückt und funktionell inaktiviert. Eine induzierte ERV-Expression durch Hemmung der DNA-Methylierung könnte die T-Zellaktion modulieren und somit krebsauslösende Zellen beim Kolorektalen Karzinom hemmen. [83]

DNMTis sind ebenfalls in der Lage, Gene wie z.B. Tumorsuppressoren und *Cancer Testis* Antigenen zu reaktivieren, die durch eine DNA-Methylierung stummgelegt wurden. Zudem induzieren DNMTis auch die Expression von transponierbaren Elementen wie z.B. endogenen Retroviren und. Dadurch werden virale Abwehrwege wieder aktiviert, sodass eine angeborene Immunreaktion und eine *Viral Mimicry* ausgelöst werden. Neben DNMTi können auch HDACi entweder einzeln oder in Kombination mit DNMTi eine ähnliche Wirkung erzielen und neue Perspektiven für die Tumorthherapie aufweisen. [84] In meiner Arbeit konnte eine vermehrte *ERV-Signature* durch Decitabine-Behandlung induziert werden, jedoch konnte in den RNA-Sequenzierungsdaten keine vermehrte Expression von *Cancer-Testis*-Antigenen und Markern für die Immunzellinflammation durch die Behandlung mit Decitabine induziert werden.

In mehreren Tumorentitäten werden ERVs stark exprimiert und stehen in präklinischen Modellen mit einer verstärkten angeborenen Immunantwort und einer besseren Wirksamkeit von Immun-Checkpoint-Inhibitoren in Verbindung, die gegen *PD-L1* gerichtet sind. [85]

Die Expression endogener Retroviren wurde auch beim Nierenzellkarzinom mit einem besseren Ansprechen auf Immun-Checkpointinhibitoren in Verbindung gebracht. Decitabine aktiviert die Expression von transponierbaren Elementen (TE) (*LINE1*, *ERV3-2* und *ERV4700*) und damit die antivirale Signalübertragung. Eine Quantifizierung der Expression von transponierbaren Elementen via RNA-Sequenzierung sprach dafür, dass die Behandlung mit Decitabine in Zellen des Nierenzellkarzinoms mit einer verstärkten Immuninfiltration und einer Reaktion auf Immuncheckpointblockaden verbunden sein kann. In einer retrospektiven Kohorte von Patienten mit metastasiertem klarzelligem Nierenzellkarzinom, die mit *Anti-PD1/PD-L1*-Inhibitoren behandelt wurden, war die Aktivierung einiger antiviraler Gene bei *Respondern* deutlich höher [78], sodass man darauf schließen kann, dass eine gesteigerte *ERV-Signature* zu einem verbesserten Ansprechen von Immuncheckpoint-Inhibitoren beitragen kann. Eine Behandlung von Urothelkarzinomzellen mit Decitabine könnte sich also über die ERV-Reaktivierung günstig auf den Therapieerfolg mit Immuncheckpoint-Inhibitoren auswirken.

Es konnte in weiteren Publikationen nachgewiesen werden, dass DNA-Methyltransferase-Inhibitoren die Expression endogener Retroviren in Tumorzellen erhöhen und somit eine wachstumshemmende Immunantwort auslösen. Eine hohe Expression von Genen, die mit der antiviralen Reaktion in Verbindung stehen scheinen z.B. beim Lungenkarzinom die Reaktion auf eine Immuncheckpoint-Therapie zu verbessern. [52] Für das Urothelkarzinom gibt es diesbezüglich noch nicht viele Daten. Jedoch zeigen die RNA-Sequenzierungsdaten dieser Arbeit eine vermehrte ERV-Signature nach Behandlung mit Decitabine in den zwei verwendeten UC-Zelllinien (BFTC-905 und UMUC-3).

Ein beträchtlicher Teil des menschlichen Genoms besteht aus transponierbaren Elemente wie langen terminalen Repeats (LTRs) endogener Retroviren besteht. Dabei wurde herausgefunden, dass LTR12 (ERV9) proapoptotische Gene induziert und durch HDAC-Inhibitoren aktiviert werden. Dabei ist die Hochregulierung von LTR12-gesteuerten Genen durch HDAC-Inhibitoren nicht auf Zellen aus Keimbahntumoren beschränkt, sondern umfasst auch Zellen verschiedener Tumorarten wie z.B. Bronchial-, Ovarial- und Zervixkarzinomzellen. [86] Weitere Untersuchungen deuten ebenfalls darauf hin, dass DNMT-Inhibition oder HDAC-Inhibition ausreichen, um eine schwache Expression von *LTR12C*-Elementen zu bewirken. Eine Reaktivierung von *ERV9/LTR12* wurde unabhängig von epigenetischen Behandlungen auch bei virusinduzierten Tumoren und in primären, mit HIV infizierten T-Zellen entdeckt. [87] Da HNSCC häufig im Zusammenhang mit Humanen Papillomaviren stehen, welche ihre onkovirale Wirkung über epigenetische Mechanismen entfalten [88], kann in diesen *ERV9/LTR12C* möglicherweise bereits exprimiert werden und durch die Behandlung mit *Epidrugs* noch verstärkt werden.

Relevant für die Entstehung des HNSCC sind sowohl die Histonacetylierung als auch die Histonmethylierung. Histonacetylasen und Histondeacetylasen interagieren auch mit den onkoviralen HPV-Proteinen E6 und E7. Durch die Interaktion von E7 und HDACs werden zelluläre Promotoren, die u.a. an der zellulären Differenzierung beteiligt sind, aktiviert. Diese sind für bestimmte Phasen des Viruslebenszyklus notwendig. Außerdem rekrutiert E7 HDAC1/2 an den Tumorsuppressor *IRF-1*, wodurch die Transkriptionsaktivierung von *IRF-1* sowie die Produktion von *IFN- $\beta$*  gehemmt werden. Möglicherweise entstehen so Mechanismen zur Umgehung des Immunsystems, die gehäuft bei HPV+ Tumorerkrankungen beobachtet wurden. [88] Da Histon(de)acetylasen wesentlich mit den onkoviralen HPV-Proteinen interagieren, kann Romidepsin als HDACi bei HNSCC eine besonders geeignete Substanz zur Vorbehandlung vor Immuntherapien darstellen.

## 5.5 Ausblick zu Kombinationsbehandlungen mit Immuntherapien

Bisher ist die CAR-T-Zelltherapie für die Behandlung von akuter und chronischer lymphatischer Leukämie sowie Lymphomen zugelassen. Noch findet die CAR-T-

Zelltherapie kein breites Anwendungsspektrum bei Patienten, da Sicherheitsbedenken aufgrund der Persistenz von CAR-T-Zellen bestehen. [45] Um breitere therapeutische Anwendungsbereiche zu erreichen, müssen Wirksamkeit und Sicherheit noch verbessert werden. Dabei stellen besonders solide Tumoren aufgrund der Komplexität der Tumormikroumgebung eine Herausforderung dar. [46] Mögliche Nebenwirkungen der Therapie mit CAR-T-Zellen sind vor allem immunpathologische Reaktionen wie Fieber, Hypotonie, Hypoxie, Neurotoxizität, Hauttoxizität, gastrointestinale Toxizität sowie multiple Organschäden bis hin zum Tod. Ursächlich hierfür sind u.a. das Zytokinfreisetzungssyndrom oder das Tumorlysesyndrom. Die Beseitigung dieser Komplikationen sind noch herausfordernd und erschweren häufig eine klinische Umsetzung der CAR-T-Zelltherapie. [89] Eine Idee der schweren Toxizität von CAR-T-Zellen entgegenzuwirken wäre eine Depletion der manipulierten T-Zellen durch die Verabreichung von Medikamenten, sollte dies möglich sein. Ein Ansatz, CAR-T-Zellen über das Medikament Ganciclovir wieder zu eliminieren, stellt die Expression der Thymidinkinase des Herpes-Simplex-Virus von der CAR-T-Zelle in der Therapie der Leukämie dar. *In vitro* konnten CAR-T-Zellen so bereits effektiv eliminiert werden. Ein anderer Ansatz, um der Toxizität entgegenzuwirken, wäre der Einsatz von Suizidgenen, welche CAR-T-Zellen zwar effizient eliminieren, jedoch auch zu einem irreversiblen Abbruch der Therapie führen würden. [46] Bisher gibt es erst vereinzelte klinische Studien zur CAR-T-Zelltherapie von HNSCC. In der klinischen Studie zur Wirksamkeit von CAR-T-Zellen gegen *ERBb (T1E28z)* konnte bei den insgesamt 12 untersuchten Patienten eine Stabilisierungsrate (*disease control rate*) von 69% erreicht werden. Weitere T-Zelltherapien mit CARs gegen HER2, das Epithelzelladhäsionsmolekül *EpCAM* und *NKG2DL* befinden sich in der klinischen Erprobung. [89]

IM HNO-Labor wurden CAR-T-Zellen gegen die Antigene EGFR und CD44v6 entwickelt. Für die Behandlung von HNSCC mit CAR-T-Zellen gegen *EGFR* konnte im HNO-Labor eine vermehrte Tumorzellyse in den Zelllinien UM-10B, UM-14C und UT-24A nachgewiesen werden, während untransduzierte und die *CD19* CAR T-Zellen der Negativkontrolle die Zielzellen nicht eliminierten. Um das *EGFR*-Expressionsniveau mit der Abtötungseffizienz zu korrelieren, wurden drei weitere Zelllinien mit unterschiedlichen *EGFR*-Expressionsmustern untersucht. Zellen der stark *EGFR*-exprimierenden Zelllinie UM-11B und der mäßig *EGFR*-exprimierenden Zelllinie UM-17A wurden bei einem Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen von 3:1 durch CAR-T-Zellen effizient zwischen 94,2 % und 82,1 % eliminiert. [47]

Zudem wurde ein hochspezifisches CAR gegen *CD44v6*, eine Isoform des Hylaronsäure-Rezeptors *CD44*, entwickelt, das mit lentiviralen Vektoren auf normalen T-Zellen exprimiert werden kann. *CD44v6* wurde ausschließlich bei soliden Tumorerkrankungen in hoher Konzentration exprimiert und mit der Tumorentstehung, Tumorzellinvasion und Metastasierung in Verbindung gebracht. Es konnte eine direkte Korrelation des Expressionsniveau von *CD44v6* auf HNSCC und Zytotoxizität der CAR-T-Zellen nachgewiesen werden. [48]

Der Einfluss von epigenetischen Inhibitoren auf die Lyse von HNSCC-Zellen durch solche CAR-T-Zellen müsste zukünftig weiter untersucht werden. Es ist bereits bekannt, dass die pharmakologische Hemmung der HDAC-Klassen I und II die Proliferation von HNSCC und die Anzahl von Krebsstammzellen, die an der Tumorentstehung und der Entwicklung von Therapieresistenzen beteiligt sind, reduziert. Aktuell wird an weiteren Therapien geforscht, die DNA-Methylierung, Histonmodifikationen, Chromatinumbau und miRNAs als wichtige Mechanismen bei der Tumorentstehung und -progression von HNSCC umfassen. [90] Bei hämatologischen Malignitäten induzierte die Behandlung mit Romidepsin eine bessere Differenzierung sowie Apoptose und einen Zellzyklusarrest und zeigte somit bereits eine vielversprechende Wirkung. Erste klinische Studien für solide Tumoren wie z.B. dem Kolonkarzinom, Mammakarzinom und Nierenzellkarzinom laufen. [91] Der Einsatz einer Transkriptionsmodulationsstrategie mit HDACis als nützliche Vorbehandlung für die Immuntherapie des malignen Melanoms wurde bereits im Mausmodell getestet. Durch die Kombination des HDACi Depsipeptid und adaptivem Immunzelltransfer von immunisierten und bestrahlten B16-Zellen wurde das metastatische Wachstum *in vivo* bei Mausmelanomzellen (B16/F10) gehemmt. [55]

Für das Urothelkarzinom stellt die Kombinationstherapie mit epigenetischen Inhibitoren und CAR-T-Zelltherapien ebenfalls einen möglichen neuen Therapieansatz dar, wozu es jedoch bisher eine sehr geringe Datenlage gibt.

Erste *in vitro* Versuche der Arbeitsgruppe in Kooperation mit dem HNO-Labor zeigten, dass CAR-T-Zellen, die gegen den *EGFR* und *CD44v6* gerichtet sind, bestimmte Urothelkarzinomzelllinien effizient und spezifisch eliminierten. Jedoch konnte der Effekt nicht für alle Zelllinien nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit Decitabine konnte dennoch die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen erhöhen. Die Vorbehandlung von UC-Zelllinien mit Decitabine verstärkte im Vergleich zu Romidepsin die Zytotoxizität von CAR-T-Zellen, die gegen *EGFR* oder *CD44v6* gerichtet waren. In der Kontrollzelllinie HBLAK wurde dieser Effekt nicht nachgewiesen [1], was dafür spricht, dass die Therapie primär Tumorzellen angreift und keine größeren Auswirkungen auf normale Urothelzellen hat. Letztendlich stellt die Kombination von Decitabine mit einer CAR-T-Zell-Therapie eine neue sehr spezifische Therapiemöglichkeit dar. Mit Hinblick auf den Mechanismus konnten die beiden Arbeitsgruppen zeigen, dass die effizientere Lyse von Decitabine behandelten UC-Zellen durch CAR-T-Zellen auf eine Verschiebung in der Balance von pro- und anti-apoptischen Regulatoren zurückgeführt werden kann. [1]

Diese Wirkung hat sich laut Literatur auch bei anderen Kombinationsbehandlungen als vorteilhaft herausgestellt. So wurde berichtet, dass Decitabine die Induktion von Apoptose und G2/M-Stillstand durch Cisplatin in UC-Zelllinien steigert. [92]

Für Romidespin konnte bei UC-Zellen keine verbesserte CAR-T-Zellyse beobachtet werden, eher sogar gegenteilige Effekte. Um auszuschließen, dass dieses auf eine toxische Wirkung von Romidepsin gegenüber den CAR-T-Zellen während der Koinkubation zurückzuführen ist, wurde das Medium, welches Ro-

midepsin enthielt, vor Koinkubation ausgewaschen. Beim Vergleich der ausgewaschenen Zellen zu den nicht ausgewaschenen UC-Zelllinien war jedoch kein signifikanter Unterschied abzuleiten. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass Romidepsin selber eher nicht zu einer Schädigung der CAR-T-Zellen geführt hat.

In einem zweiten Schritte sollte untersucht werden ob zusätzlich zu Romidepsin eine Behandlung mit Atezolizumab, dem Checkpointinhibitor gegen PD-L1, die lytische Effizienz der CAR-T-Zellen steigern könnte. Hierbei konnten keine nennenswerten Unterschiede festgestellt werden. Da es sich jedoch hierbei um erste preliminäre Testreihen handelte und keine Angaben für in vitro Dosierungen und Inkubationszeiten von Atezolizumab vorlagen, sind hier zukünftig weitere Analysen notwendig. Daher wurden in dieser Arbeit zunächst hohe und niedrige Dosierungen von Atezolizumab verglichen. Hier zeigte sich tendentiell ein stärkerer Effekt für die höhere Dosis (100 µg). Nach 8 Stunden Inkubationszeit mit Atezolizumab zeigte sich kein eindeutiger Effekt. Daher wurde die Inkubationszeit in der folgenden Messung verkürzt. Jedoch konnte auch nach 4 Stunden Inkubation der UC-Zelllinien mit Atezolizumab keine verbesserte Elimination von Tumorzellen nachgewiesen werden. Folglich sind weitere Untersuchungen bezüglich der genauen Dosierung und Behandlungsdauer notwendig.

In klinischen Studien werden für das Urothelkarzinom zur Zeit andere Kombinationsbehandlungen mit Immuncheckpoint-Inhibitoren untersucht. Hierzu zählen sowohl die Kombination von zwei verschiedenen Immuncheckpointinhibitoren (z.B. Atezolizumab und Pembrolizumab) als auch die Kombination von Checkpointinhibitoren mit einer Chemotherapie oder neuen zielgerichteten Therapien wie z.B. dem Antikörper-Toxin-Konjugat Enfortumab Vedotin. Mit Hinblick auf die Kombination mit Chemotherapie liegen je nach Checkpointinhibitor widersprüchliche Ergebnisse zum Überlebensvorteil vor. Zudem spricht nur ein Teil der Patienten auf die Immuntherapie an. [14, 93] Studienergebnisse aus 2024 dazu deuten an, dass die Kombination aus Enfortumab Vedotin und Pembrolizumab gegenüber einer Chemotherapie bzgl. des Überlebens von Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung überlegen ist. [8, 14] Entsprechend ist es noch zu früh, um eine finale Schlussfolgerung über die Wirksamkeit von spezifischen Kombinationstherapien zu treffen, da kombinatorische Therapien die Komplexität deutlich erhöhen, jedoch scheinen Kombinationsbehandlungen einen potenziell vielversprechenden Ansatz zur Behandlung des Urothelkarzinoms darzustellen.

Da PD-1 und CTLA-4-Signalwege häufig zur Umgehung von Komponenten des Immunsystems genutzt werden, erscheint eine Kombinationstherapie aus Anti-PD-1- und Anti-CTLA-4-Antikörper sinnvoll. Hier konnten bereits signifikante präklinische und klinische Reaktionen zu dieser Kombination gezeigt werden. Durch ein gleichzeitiges Angreifen von Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen konnte einer zuvor bestehenden T-Zelldysfunktion entgegengewirkt werden. [94]

Da die Mutation und Dysregulation von epigenetischen Enzymen beim Urothelkarzinom im Vergleich zu anderen Malignitäten besonders häufig vorkommen, stellen epigenetische Inhibitoren einen gezielten Angriffspunkt und damit eine zusätzliche Chance für die Tumorthherapie des Urothelkarzinoms dar. Bislang wird die epigenetische Therapie hauptsächlich bei hämatologischen Malignomen angewendet. Zu soliden Tumoren sind noch weitere Untersuchungen notwendig, da sich die Eigenschaften von hämatologischen Malignitäten von soliden Tumoren deutlich unterscheiden. Auch die Kombination von epigenetischer Therapie und Immuntherapie wurde in präklinischen und klinischen Versuchen untersucht. [95] Bis sich entsprechende Kombinationstherapien beim Urothelkarzinom etablieren, ist ein besseres Verständnis der spezifischen Mechanismen der Auswirkung von epigenetischen Behandlungen auf den Immunphänotyp der UC-Zellen notwendig. Sicherlich gibt es noch eine Vielzahl von möglichen Kombinationstherapien, die noch entdeckt werden können und weiterer Untersuchungen bedürfen.

## 6 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Grunewald, C.M., et al., *Epigenetic Priming of Bladder Cancer Cells With Decitabine Increases Cytotoxicity of Human EGFR and CD44v6 CAR Engineered T-Cells*. *Front Immunol*, 2021. **12**: p. 782448.
2. Marur, S., et al., *HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic*. *Lancet Oncol*, 2010. **11**(8): p. 781-9.
3. Johnson, D.E., et al., *Head and neck squamous cell carcinoma*. *Nat Rev Dis Primers*, 2020. **6**(1): p. 92.
4. Mehra, R., K.K. Ang, and B. Burtness, *Management of human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head and neck cancer*. *Semin Radiat Oncol*, 2012. **22**(3): p. 194-7.
5. Galmiche, A., et al., *Genomics and precision surgery for head and neck squamous cell carcinoma*. *Cancer Lett*, 2020. **481**: p. 45-54.
6. Bonner, J.A., et al., *Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(6): p. 567-78.
7. Harrington, K.J., et al., *Nivolumab versus standard, single-agent therapy of investigator's choice in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (CheckMate 141): health-related quality-of-life results from a randomised, phase 3 trial*. *Lancet Oncol*, 2017. **18**(8): p. 1104-1115.
8. Rischin, D., et al., *Protocol-specified final analysis of the phase 3 KEYNOTE-048 trial of pembrolizumab (pembro) as first-line therapy for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC)*. *Journal of Clinical Oncology*, 2019. **37**(15\_suppl): p. 6000-6000.
9. Morris, L.G.T., et al., *The Molecular Landscape of Recurrent and Metastatic Head and Neck Cancers: Insights From a Precision Oncology Sequencing Platform*. *JAMA Oncol*, 2017. **3**(2): p. 244-255.
10. Schmelz, H.-U., C. Sparwasser, and W. Weidner, *Facharztwissen Urologie*. 2014.
11. Ferlay, J., et al., *Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012*. *Int J Cancer*, 2015. **136**(5): p. E359-86.
12. Hupe, M.C., G. Gakis, and R. Seiler, *Molecular tumor board-urothelial cancer*. *Urologe A*, 2019. **58**(7): p. 760-767.
13. *Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Harnblasenkarzinoms, Kurzversion 2.0*. 2020 March 2020; AWMF-

- Registrierungsnummer 032/038OL]. Available from: <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Harnblasenkarzinom.92.0.html>.
14. Jones, R.J., et al., *Systemic anticancer therapy for urothelial carcinoma: UK oncologists' perspective*. Br J Cancer, 2024. **130**(6): p. 897-907.
  15. Retz, M., et al., *[Sequential therapy of advanced bladder cancer after prior perioperative systemic treatment : Recommendations from the Interdisciplinary Bladder Carcinoma Working Group (IABC) of the DKG e. V.]*. Urologie, 2023. **62**(10): p. 1064-1069.
  16. Balar, A.V., et al., *First-line pembrolizumab in cisplatin-ineligible patients with locally advanced and unresectable or metastatic urothelial cancer (KEYNOTE-052): a multicentre, single-arm, phase 2 study*. Lancet Oncol, 2017. **18**(11): p. 1483-1492.
  17. Niegisch, G., et al., *[Signal transduction in urothelial cancer: how exactly do we know the targets for targeted therapy?]*. Urologe A, 2010. **49**(11): p. 1401-5.
  18. Ascione, C.M., et al., *Role of FGFR3 in bladder cancer: Treatment landscape and future challenges*. Cancer Treat Rev, 2023. **115**: p. 102530.
  19. Harb-De la Rosa, A.A., M; Kumar, Ra; Manoharan, M., *Epigenetic application in the diagnosis and treatment of bladder cancer*. The Canadian Journal of Urology, 2015. **22**(5): p. 7947-7951.
  20. G. Niegisch, M.J.H., E.A. Koutsogiannouli, W.A. Schulz *Epigenetics in urothelial cancer*. Der Urologe, 2015(54): p. 526–532.
  21. Jeronimo, C. and R. Henrique, *Epigenetic biomarkers in urological tumors: A systematic review*. Cancer Lett, 2014. **342**(2): p. 264-74.
  22. Hoffmann, M.J. and W.A. Schulz, *Alterations of Chromatin Regulators in the Pathogenesis of Urinary Bladder Urothelial Carcinoma*. Cancers (Basel), 2021. **13**(23).
  23. VanderMolen, K.M., et al., *Romidepsin (Istodax, NSC 630176, FR901228, FK228, depsipeptide): a natural product recently approved for cutaneous T-cell lymphoma*. J Antibiot (Tokyo), 2011. **64**(8): p. 525-31.
  24. Suraweera, A., K.J. O'Byrne, and D.J. Richard, *Combination Therapy With Histone Deacetylase Inhibitors (HDACi) for the Treatment of Cancer: Achieving the Full Therapeutic Potential of HDACi*. Front Oncol, 2018. **8**: p. 92.
  25. Li, Q.Q., et al., *Histone deacetylase inhibitor-induced cell death in bladder cancer is associated with chromatin modification and modifying protein expression: A proteomic approach*. Int J Oncol, 2016. **48**(6): p. 2591-607.

26. Sarkar S, A.A., Loew JE, Forman LW, Perrine SP, Faller DV, *Histone deacetylase inhibitors reverse CpG methylation by regulating DNMT1 through ERK signaling*. *Anticancer Res.*, 2011. **31(9):2723-32.** .
27. Wang, C., et al., *Combination of Decitabine and Entinostat Synergistically Inhibits Urothelial Bladder Cancer Cells via Activation of FoxO1*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12(2)**.
28. Carter, C.A., et al., *No patient left behind: The promise of immune priming with epigenetic agents*. *Oncoimmunology*, 2017. **6(10)**: p. e1315486.
29. Trujillo, J.A., et al., *T Cell-Inflamed versus Non-T Cell-Inflamed Tumors: A Conceptual Framework for Cancer Immunotherapy Drug Development and Combination Therapy Selection*. *Cancer Immunol Res*, 2018. **6(9)**: p. 990-1000.
30. Fuertes, M.B., et al., *Host type I IFN signals are required for antitumor CD8+ T cell responses through CD8alpha+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2011. **208(10)**: p. 2005-16.
31. Dunn, J. and S. Rao, *Epigenetics and immunotherapy: The current state of play*. *Mol Immunol*, 2017. **87**: p. 227-239.
32. Bui, T.M., H.L. Wiesolek, and R. Sumagin, *ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis*. *J Leukoc Biol*, 2020. **108(3)**: p. 787-799.
33. Peter, M.E., et al., *The role of CD95 and CD95 ligand in cancer*. *Cell Death Differ*, 2015. **22(4)**: p. 549-59.
34. Vivier, E., et al., *Functions of natural killer cells*. *Nat Immunol*, 2008. **9(5)**: p. 503-10.
35. Mou, X., et al., *The regulatory effect of UL-16 binding protein-3 expression on the cytotoxicity of NK cells in cancer patients*. *Sci Rep*, 2014. **4**: p. 6138.
36. Tokunaga, R., et al., *CXCL9, CXCL10, CXCL11/CXCR3 axis for immune activation - A target for novel cancer therapy*. *Cancer Treat Rev*, 2018. **63**: p. 40-47.
37. Zumwalt, T.J., et al., *Active secretion of CXCL10 and CCL5 from colorectal cancer microenvironments associates with GranzymeB+ CD8+ T-cell infiltration*. *Oncotarget*, 2015. **6(5)**: p. 2981-91.
38. Mlecnik, B., et al., *Biomolecular network reconstruction identifies T-cell homing factors associated with survival in colorectal cancer*. *Gastroenterology*, 2010. **138(4)**: p. 1429-40.
39. Loo Yau, H., I. Ettayebi, and D.D. De Carvalho, *The Cancer Epigenome: Exploiting Its Vulnerabilities for Immunotherapy*. *Trends Cell Biol*, 2019. **29(1)**: p. 31-43.

40. Roulois, D., et al., *DNA-Demethylating Agents Target Colorectal Cancer Cells by Inducing Viral Mimicry by Endogenous Transcripts*. *Cell*, 2015. **162**(5): p. 961-73.
41. Leisching, G., I. Wiid, and B. Baker, *The Association of OASL and Type I Interferons in the Pathogenesis and Survival of Intracellular Replicating Bacterial Species*. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017. **7**: p. 196.
42. Green, J.L., et al., *Molecular characterization of type I IFN-induced cytotoxicity in bladder cancer cells reveals biomarkers of resistance*. *Mol Ther Oncolytics*, 2021. **23**: p. 547-559.
43. Crosse, K.M., et al., *Interferon-Stimulated Genes as Enhancers of Antiviral Innate Immune Signaling*. *J Innate Immun*, 2018. **10**(2): p. 85-93.
44. DeDiego, M.L., et al., *Interferon-Induced Protein 44 Interacts with Cellular FK506-Binding Protein 5, Negatively Regulates Host Antiviral Responses, and Supports Virus Replication*. *mBio*, 2019. **10**(4).
45. Singh, S., et al., *Chimeric antigen receptor T cell: A cancer immunotherapy*. *Indian J Pharmacol*, 2022. **54**(3): p. 226-233.
46. Hong, M., J.D. Clubb, and Y.Y. Chen, *Engineering CAR-T Cells for Next-Generation Cancer Therapy*. *Cancer Cell*, 2020. **38**(4): p. 473-488.
47. Haist, C., et al., *Engineering a single-chain variable fragment of cetuximab for CAR T-cell therapy against head and neck squamous cell carcinomas*. *Oral Oncol*, 2022. **129**: p. 105867.
48. Haist, C., et al., *CD44v6-targeted CAR T-cells specifically eliminate CD44 isoform 6 expressing head/neck squamous cell carcinoma cells*. *Oral Oncol*, 2021. **116**: p. 105259.
49. Oliveros, J.C. Venny. *An interactive tool for comparing lists with Venn's diagrams*. <https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html> 2007-2015.
50. Simpson, A.J., et al., *Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(8): p. 615-25.
51. Pishesha, N., T.J. Harmand, and H.L. Ploegh, *A guide to antigen processing and presentation*. *Nat Rev Immunol*, 2022. **22**(12): p. 751-764.
52. Chiappinelli, K.B., et al., *Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses*. *Cell*, 2015. **162**(5): p. 974-86.
53. Gross, E., J.B. Sunwoo, and J.D. Bui, *Cancer immunosurveillance and immunoediting by natural killer cells*. *Cancer J*, 2013. **19**(6): p. 483-9.
54. Riccadonna, C., et al., *Decitabine Treatment of Glioma-Initiating Cells Enhances Immune Recognition and Killing*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0162105.

55. Murakami, T., et al., *Transcriptional modulation using HDACi depsipeptide promotes immune cell-mediated tumor destruction of murine B16 melanoma*. J Invest Dermatol, 2008. **128**(6): p. 1506-16.
56. Li, W., et al., *Relationship between aberrant methylation of FAS promoter and biological behavior of bladder urothelial carcinoma*. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011. **31**(6): p. 794-798.
57. Saberi, E., et al., *Analysis of methylation and mRNA expression status of FADD and FAS genes in patients with oral squamous cell carcinoma*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2014. **19**(6): p. e562-8.
58. Singh, M., et al., *Gene regulation of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1): A molecule with multiple functions*. Immunol Lett, 2021. **240**: p. 123-136.
59. Kantari-Mimoun, C., et al., *CAR T-cell Entry into Tumor Islets Is a Two-Step Process Dependent on IFN $\gamma$  and ICAM-1*. Cancer Immunol Res, 2021. **9**(12): p. 1425-1438.
60. Otto, T., et al., *Markersysteme beim Harnblasenkarzinom*. Der Urologe B, 2014. **37**(3): p. 209-215.
61. Klebe, M., et al., *[CpG-ODN instillation boosts ICAM-1 expression in an orthotopic murine UCC model: immunohistochemical evaluation of the local response to immunostimulatory DNA]*. Aktuelle Urol, 2024. **55**(2): p. 154-160.
62. Hellebrekers, D.M., et al., *Epigenetic regulation of tumor endothelial cell anergy: silencing of intercellular adhesion molecule-1 by histone modifications*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10770-7.
63. Scher, R.L., W.M. Koch, and W.J. Richtsmeier, *Induction of the intercellular adhesion molecule (ICAM-1) on squamous cell carcinoma by interferon gamma*. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 1993. **119**(4): p. 432-8.
64. Schneider, A.K., M.F. Chevalier, and L. Derre, *The multifaceted immune regulation of bladder cancer*. Nat Rev Urol, 2019. **16**(10): p. 613-630.
65. Hecht, M., R. Fietkau, and U.S. Gaipl, *[Definitive chemoradiotherapy of locally advanced head and neck cancer in combination with immune checkpoint inhibition-new concepts required]*. Strahlenther Onkol, 2022. **198**(1): p. 83-85.
66. Gevaert, T., et al., *Predictive biomarkers for immunotherapy in the treatment of advanced urothelial carcinoma: where we stand and where we go*. Future Oncol, 2019. **15**(19): p. 2199-2202.

67. Chen, Y., et al., *The current advances and future directions of PD-1/PD-L1 blockade in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in the era of immunotherapy*. *Int Immunopharmacol*, 2023. **120**: p. 110329.
68. Morisaki, T., et al., *NKG2D-directed cytokine-activated killer lymphocyte therapy combined with gemcitabine for patients with chemoresistant metastatic solid tumors*. *Anticancer Res*, 2014. **34**(8): p. 4529-38.
69. Schmiedel, B.J., et al., *Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation*. *Int J Cancer*, 2011. **128**(12): p. 2911-22.
70. Martins-Lima, C., et al., *Tumor microenvironment and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: Cytokines in the game?* *Front Mol Biosci*, 2022. **9**: p. 1070383.
71. Feng, W., et al., *Activation of the chemokine receptor 3 pathway leads to a better response to immune checkpoint inhibitors in patients with metastatic urothelial carcinoma*. *Cancer Cell Int*, 2022. **22**(1): p. 186.
72. Zhang, X.F., et al., *The regulatory network of the chemokine CCL5 in colorectal cancer*. *Ann Med*, 2023. **55**(1): p. 2205168.
73. Shen, J., et al., *CCL5 promotes the proliferation and metastasis of bladder cancer via the JAK2/STAT3 signaling pathway*. *Transl Androl Urol*, 2023. **12**(12): p. 1845-1858.
74. Aldinucci, D., C. Borghese, and N. Casagrande, *The CCL5/CCR5 Axis in Cancer Progression*. *Cancers (Basel)*, 2020. **12**(7).
75. Gonzalez-Arriagada, W.A., et al., *CR5/CCL5 axis is linked to a poor outcome, and inhibition reduces metastasis in oral squamous cell carcinoma*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2023. **149**(19): p. 17335-17346.
76. Ashiru, O., et al., *BCG Therapy of Bladder Cancer Stimulates a Prolonged Release of the Chemoattractant CXCL10 (IP10) in Patient Urine*. *Cancers (Basel)*, 2019. **11**(7).
77. Wightman, S.C., et al., *Oncogenic CXCL10 signalling drives metastasis development and poor clinical outcome*. *Br J Cancer*, 2015. **113**(2): p. 327-35.
78. de Cubas, A.A., et al., *DNA hypomethylation promotes transposable element expression and activation of immune signaling in renal cell cancer*. *JCI Insight*, 2020. **5**(11).
79. Karpf, A.R., et al., *Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(24): p. 14007-12.

80. Liang, G., et al., *Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine*. *Cancer Res*, 2002. **62**(4): p. 961-6.
81. Wang, H., et al., *Knockdown of IFI27 inhibits cell proliferation and invasion in oral squamous cell carcinoma*. *World J Surg Oncol*, 2018. **16**(1): p. 64.
82. Huang, S., et al., *Interferon alpha-inducible protein 27 (IFI27) is a prognostic marker for pancreatic cancer based on comprehensive bioinformatics analysis*. *Bioengineered*, 2021. **12**(1): p. 8515-8528.
83. Zhou, J.G., et al., *Identification of an endogenous retroviral signature to predict anti-PD1 response in advanced clear cell renal cell carcinoma: an integrated analysis of three clinical trials*. *Ther Adv Med Oncol*, 2022. **14**: p. 17588359221126154.
84. Jones, P.A., et al., *Epigenetic therapy in immune-oncology*. *Nat Rev Cancer*, 2019. **19**(3): p. 151-161.
85. Lecuelle, J., et al., *MER4 endogenous retrovirus correlated with better efficacy of anti-PD1/PD-L1 therapy in non-small cell lung cancer*. *J Immunother Cancer*, 2022. **10**(3).
86. Kronung, S.K., et al., *LTR12 promoter activation in a broad range of human tumor cells by HDAC inhibition*. *Oncotarget*, 2016. **7**(23): p. 33484-97.
87. Brocks, D., et al., *DNMT and HDAC inhibitors induce cryptic transcription start sites encoded in long terminal repeats*. *Nat Genet*, 2017. **49**(7): p. 1052-1060.
88. Ghiani, L. and S. Chiocca, *High Risk-Human Papillomavirus in HNSCC: Present and Future Challenges for Epigenetic Therapies*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(7).
89. Wang, H.Q., et al., *Advances in CAR-T Cell Therapy in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. *J Clin Med*, 2023. **12**(6).
90. Castilho, R.M., C.H. Squarize, and L.O. Almeida, *Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer: Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy*. *Int J Mol Sci*, 2017. **18**(7).
91. Castro-Munoz, L.J., et al., *Modulating epigenetic modifications for cancer therapy (Review)*. *Oncol Rep*, 2023. **49**(3).
92. Shang, D., et al., *Demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine enhances susceptibility of bladder transitional cell carcinoma to Cisplatin*. *Urology*, 2008. **71**(6): p. 1220-5.
93. Schulz, G.B. and P.C. Black, *Combination therapies involving checkpoint-inhibitors for treatment of urothelial carcinoma: a narrative review*. *Transl Androl Urol*, 2021. **10**(10): p. 4014-4021.

94. Peng, M., et al., *Novel Combination Therapies for the Treatment of Bladder Cancer*. *Front Oncol*, 2020. **10**: p. 539527.
95. Cheng, Y., et al., *Targeting epigenetic regulators for cancer therapy: mechanisms and advances in clinical trials*. *Signal Transduct Target Ther*, 2019. **4**: p. 62.

## 7 Anhang

### RNA-Sequenzierung

#### 56 common elements in "BFTC-905 DEC d3<sup>↑</sup>" and "UMUC-3 DEC d3<sup>↑</sup>":

GTSF1	SNAI1	GRIN2D
XAF1	APOE	CASZ1
CKM	IFIT2	ICAM1
IFI27	HR	COL1A1
SUSD2	MCAM	SERTAD1
AFAP1-AS1	ATF5	VASN
GGT5	IL32	CORO1A
IFFO1	S100A4	PLEKHF1
QPRT	FCHO1	KRT8
BISPR	SCG5	RAB17
GCNA	GPER1	UNC13D
IL2RB	PEAR1	SERPINF1
CCL5	NES	MAP6D1
BST2	MYL9	RBM38
IFITM2	NOS3	TNFAIP2
IFIT3	C3	DNMT3B
CREB3L1	CABLES1	CLDN4
TNNC1	CRABP2	RPP40
LRG1	MPV17L2	

#### 17 common elements in "BFTC-905 DEC d3<sup>↓</sup>" and "UMUC-3 DEC d3<sup>↓</sup>":

CDH4	TMEM8B	PC
SNCAIP	GMDS	PAQR8
ZC3H6	TTL1	RPS6KA2
TMC7	B3GNTL1	BCL6
CTD-3184A7.4	C1orf21	C11orf80
WWOX	LTBP1	

#### 10 common elements in "BFTC-905 DEC d3<sup>↓</sup>" and "UMUC-3 DEC d3<sup>↑</sup>":

INPP5D	SESN3	COL6A1
NGEF	H19	SH3TC1
PLCH2	SH3BP1	
CSPG4	PLTP	

#### 12 common elements in "BFTC-905 DEC d3<sup>↑</sup>" and "UMUC-3 DEC d3<sup>↓</sup>":

LINC00707	SAMD9L	C14orf132
NAV3	RAB3B	MYH16
G0S2	PSORS1C1	TMEM51

MYLK

GLIPR1

HBEGF

**207 common elements in "BFTC-905 DEC d7↑" and "UMUC-3 DEC d7↑":**

MAGEB2	DNMT3B	PLK1
TDRD1	CDCA5	DLGAP5
GTSF1	DDIAS	CDCA3
PNMA5	QPRT	WDR4
SLC12A3	OAS2	SPAG5
DCAF4L1	SHCBP1	CCNA2
MAGEA4	CENPF	FAM72B
OVAAL	WDR62	BST2
SLC15A3	IFIT1	NQO1
CD93	IFIT3	TFRC
AFAP1-AS1	SLC43A2	MYBL1
CD74	KIF23	ERCC6L
LINC01694	KNL1	TK1
AP000439.1	DHRS2	TOP2A
GCNA	GTSE1	FAM46B
ERVH48-1	DPF1	KPNA2
TRIM55	FAM72A	TPX2
PSORS1C2	PKMYT1	TTK
IFI27	CCNB1	GTF2IP13
TRIML2	CDCA2	KIF11
MCAM	NCAPH	AURKA
SUSD2	BIRC5	NEK2
RP11-206M11.7	SPC25	CRISPLD2
SLC7A7	TACC3	KIFC1
XAF1	IFIT2	NUSAP1
MYBL2	BUB1	BUB1B
KRT81	DEPDC1	TNFRSF1B
FOXM1	NCAPG	ESPL1
SPOCK2	NDC80	AURKB
CORO1A	KIF20A	BRCA1
RSAD2	STIL	KIF2C
RP11-20D14.6	FANCD2	CDCA8
SKA1	TROAP	RAB17
CYGB	RRM2	CCNF
SLC16A4	HCLS1	HR
SLC17A9	ASPM	ASF1B
PTGIS	KIF4A	SGO2
MKI67	KIF18B	CDC25C
FAM222A-AS1	KIF14	NUF2
CDC20	RAD54L	ORC6
MORN3	TNFAIP2	UHRF1

SERPINF1	AK1	MPV17L2
UBE2C	FBLN1	GCNT2
PRC1	PBK	IL20RB
LMNB1	CKS2	TBCD
FAM64A	HAUS8	ARHGEF39
SYT12	GATA2	CIDECF
RFC2	KIF22	TNS3
UBE2S	POLR3K	PFAS
ALPK3	MAP3K14	TRA2B
TIGAR	SLC7A5	GRIN2D
POC1A	ATF5	HNRNPA2B1
CHAF1A	CCDC137	IFITM3
SLC25A33	NCAPD2	KRT18
CCNB2	KRT8	TRMU
POLE	MDK	S100A4
MYO5C	RTEL1	TFPT
KIF15	PSRC1	AIMP2
CRABP2	TUBA1B	CASZ1
ISG15	SLC25A20	UPK3B
MAD2L1	RASSF3	THOP1
FANCA	NUP210	FADS2
DNMT1	KNSTRN	AP1S3
TYMS	COTL1	AIFM1
CDK1	PLEKHF1	ANK1
CDC25B	CTD-2267D19.3	PDCD11
CIT	DDX58	ZC3HAV1
PADI3	SLC30A1	KIF7
INCENP	FLNC	NUP188

**92 common elements in "BFTC-905 DEC d7↓" and "UMUC-3 DEC d7↓":**

LRRC4B	CD68	TBC1D3L
MMP10	NRG2	RP11-276H19.2
SHC2	TSLP	FAM171A2
ITGB3	RRAGD	NFASC
TMEM59L	MAPT	SLC16A9
BAIAP3	DGCR5_1	IDUA
GNAL	LINC02154	SNCAIP
PDE9A	LY96	CACNG4
MEGF6	RTN4R	PPM1J
CLYBL	SATB1	A1BG
PIGZ	ANKRD29	ADAM23
MYH16	FZD8	DENND6B
PIK3AP1	KLF12	PPP4R4
ANG	GARNL3	EXD3

CCDC149	CLMN	GAB2
MLF1	RAG1	CDH2
PLEKHH1	ZNF579	C1orf21
GPR137B	SLC4A3	NEO1
C14orf93	ICA1	TSC22D1
CYB5R2	TMOD2	C11orf80
IL31RA	CCDC80	TIGD5
ZNF358	IFI27L2	MR1
SLCO1B3	ATP6V0D2	ARL4C
C6orf1	WDR31	MSMO1
RP11-465B22.3	PLEKHH2	B3GNT5
FAM175A	GTF2IRD2B	TMEM150A
SUPT3H	ETNK2	KIAA1324L
AC007246.3	ARHGEF40	PGM2L1
BMPR1B	GNAO1	HDAC11
PRKCDBP	CDKL5	VEGFC
SPSB3	HS1BP3	

**73 common elements in "BFTC-905 DEC d7↓" and "UMUC-3 DEC d7↑":**

ONECUT3	H19	CACNG6
HYAL1	RYR1	GAMT
CLMP	KCNAB2	EPOR
INPP5D	FAM83A	SH3TC1
NGEF	PDGFB	ADAP1
TMC4	APOC1	SLC13A3
ATP8B3	PTK6	LMTK3
SH2D2A	KLHDC8B	APOE
MT1L	RAB3A	HIST1H2BK
HIST1H2BD	DDAH2	MTHFR
KLC3	COL8A2	NDRG4
TMC8	SPON2	LPAR5
PCDHGA9	CTF1	SPRY4
PDGFA	HIST1H1C	FOXK1
CYTH4	FUCA1	TRIB2
JAK3	SESN3	GDF15
CILP2	PAOX	COL9A3
LEPR	NOL4L	CDKN1A
CSPG4	ICAM5	SLC16A3
MSLN	DBP	TMEM173
NFATC4	AHRR	SH3BP1
FCGRT	SIGIRR	AC124789.1
LSP1	TJP3	TMEM102
HIST1H2AE	TLCD2	
RAB40B	OPLAH	

**43 common elements in "BFTC-905 DEC d7↑" and "UMUC-3 DEC d7↓":**

GABBR2	ITGBL1	PARP12
SNTB1	TMEM170B	KITLG
IQGAP2	BEND7	LRRC45
SAMD9L	CEP78	TSPAN33
CYFIP2	TCF7	GPNMB
SLAIN1	HERC6	L3HYPDH
NOG	SYTL3	SAP30
NXPH4	SLC1A3	DDAH1
TRANK1	TBC1D30	PCYT2
TRAF1	COBL	C4orf32
NEXN	SHROOM3	ADRA1B
FLVCR2	CTH	TLR6
GBP1	FZD2	BAG1
TLR3	DUXAP9	
RBM20	LRRCC1	

**48 common elements in "BFTC-905 DEC d7↑" and "UT-33 DEC d7↑":**

SEN3-EIF4A1	MYBL2	UHRF1
GTSF1	SLC16A4	LMNB1
PNMA5	QPRT	TCF7
SLC12A3	FHAD1	UCHL1
DCAF4L1	TACC3	PADI3
OVAAL	HCLS1	SERTAD4
AP000439.1	CDC6	ENG
GCNA	TK1	TRIM59
LINC01819	RARRES3	FBLN1
SRGN	TNFRSF1B	GATA2
TMEM52B	ITGBL1	TGM2
TNF	RAB17	SH2B3
SAA1	LOXL3	AKAP2
ROS1	HR	S100A4
SUSD2	RP1-152L7.5	ANK1
SLC7A7	FOLR1	RBM38

**1 common element in "UMUC-3 DEC d7 ↓" and "UT-33 DEC d7 ↓":**

PAPLN

**10 common elements in "BFTC-905 DEC d7 ↓" and "UT-33 DEC d7 ↑":**

RP11-514P8.6	MYRF	PSCA
H19	FRMD3	SPRY4
KCNAB2	TNXB	
ANGPTL2	MALL	

**1 common element in "BFTC-905 DEC ↑" and "UT-33 DEC ↓":**  
ADAMTS6

**67 common elements in "UMUC-3 DEC d7 ↑" and "UT-33 DEC d7 ↑":**

BGN	UNC13D	SSC5D
TNFRSF6B	PLPP7	POU2F2
RAB17	MISP	HR
AP000439.1	ECSCR	ITGB4
SLC12A3	ANPEP	OASL
GTSF1	HHIPL2	MYBL2
MRGPRF	QPRT	OVAAL
XAGE1B	CLIP3	SPRY4
ANGPTL7	COL6A3	CITED4
XAGE1A	LOXL1	UHRF1
HCLS1	TMEM92	VASN
PPL	STRA6	TK1
LAPTM5	TMEM119	PGF
GCNA	IFITM2	KCNAB2
PNMA5	TNNC1	PADI3
EMILIN1	ANK1	TACC3
SUSD2	SERPINA1	SLCO4A1
DCAF4L1	SLC16A4	GATA2
FERMT3	MXRA8	LMNB1
H19	GSTM2	JUP
GGT5	TNFRSF1B	FBLN1
S100A4	FAM43A	
CD248	SLC7A7	

**5 common elements in "UMUC-3 DEC d7 ↓" and "UT-33 DEC d7 ↑":**

MMP1	TCF7	KLF4
ITGBL1	SOX9	

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen beteiligten Personen danken, die mich bei der Anfertigung meiner Dissertation unterstützt haben.

Zunächst gilt mein ganz besonderer Dank Priv.-Doz. Dr. Michèle Hoffmann und dem urologischen Forschungslabor für die hervorragende Betreuung und die enorme Unterstützung bei der Durchführung und Umsetzung der gesamten Arbeit. Eine bessere Betreuung hätte ich mir nicht vorstellen können. Michèle Hoffmann hat mich nicht nur einzigartig betreut, sie stand mir stets für alle Fragen zur Seite und hat sich um jedes Anliegen in kürzester Zeit gekümmert. Das weiß ich wirklich sehr zu schätzen.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Camilla Grunewald bedanken, die mir bei den ersten Versuchen stets zur Seite gestanden hat und mich in ihr Projekt eingeführt hat.

Auch möchte ich Priv.-Doz. Dr. med. Kathrin Scheckenbach als meine Co-Betreuerin meinen Dank aussprechen, die mich unterstützt hat, mir weitere Einblicke in das HNO-Forschungslabor ermöglichte und freundlicherweise Material zur Verfügung stellte. Besonders möchte ich mich auch bei Corinna Haist bedanken, die mir viel zu ihrer Forschung erklären konnte und stets für Fragen zur Seite stand.

Neben Zoe Poschinski habe ich zeitweise Versuche durchgeführt und möchte ihr für die sehr angenehme Zusammenarbeit, gute Absprache und Teamfähigkeit danken.

Mein persönlicher Dank gebührt meiner Familie und vor allem meinen Eltern Dagmar und Paul-Uwe, denen ich diese Promotionsschrift widme. Ich bin nicht nur dankbar für ihre Ermutigungen und Zusprüche während der Verfassung dieser Doktorarbeit, sondern vor allem dafür, dass ich in jedem Lebensabschnitt immer auf ihre volle Unterstützung zählen kann. Ohne meine Eltern wäre ich heute nicht so weit gekommen. Sie haben immer an mich geglaubt und sind bedingungslos für mich da. Auch auf die Unterstützung meiner Schwestern Antonia und Louisa kann ich jederzeit zählen. Ich bin euch unendlich dankbar für alles.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinem Freund Tobias bedanken, der mich in stressigen Situationen auffängt und mit einem gemeinsamen Tanzkurs motiviert stets an dieser Arbeit zu schreiben. Ich freue mich schon auf gemeinsame Tanzstunden mit dir und danke dir von Herzen, dass du mich so liebst und an mich glaubst.