

# **Regulationsmechanismen des Immuncheckpoints PD-L1 der Schilddrüsenkarzinomzelllinien B-CPAP und CAL-62**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

**Matthias Paolo Klemke**

aus Bonn

2024

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Essler

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Hölzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 25. November 2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Nuklearmedizin

Gewidmet meinen Eltern



## Inhaltsverzeichnis

### Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	12
1.1 Das Schilddrüsenkarzinom .....	12
1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie .....	12
1.1.2. Einteilung, Klinik und Diagnostik .....	13
1.1.3. Therapie, Prognose und Nachsorge .....	14
1.2. Neue Therapieoptionen für das fortgeschrittene Schilddrüsenkarzinom .....	16
1.2.1. Blockade dysregulierter, onkogener Signalwege .....	17
1.3. Immuntherapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren .....	19
1.3.1. Grundlagen des Immunsystems.....	19
1.3.2. Zelluläre Regulationsmechanismen des Immuncheckpoints PD-L1.....	19
1.3.3. Immun- und Kombinationstherapien als Hoffnungsträger .....	20
1.4. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit.....	21
<b>2. Material und Methoden</b> .....	22
2.1. Materialien .....	22
2.1.1. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien .....	22
2.1.2. Chemikalien und Reagenzien .....	24
2.1.3. Zytokine und Zytokin neutralisierende Antikörper .....	26
2.1.4. Signalweginhibitoren.....	26
2.1.5. Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen .....	27
2.1.6. Kommerzielle Fertigsysteme „Kits“ und Assays .....	29
2.1.7. Enzyme und Größenstandards .....	29
2.1.8. Antikörper für den Westernblot .....	29

2.1.9. Oligonukleotid-Primer für die PCR.....	31
2.1.10. Elektronische Datenbanken .....	31
2.1.11. Zellkultur .....	31
2.1.11.1. Zelllinien und Kulturbedingungen.....	31
2.1.11.2. Kryokonservierung, Auftauen und Passagieren der Zellen.....	33
2.2. Methoden.....	34
2.2.1. Molekularbiologie .....	34
2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion .....	34
2.2.1.1.1. PD-L1 und CTLA-4 Primerdesign.....	34
2.2.1.1.2. RNA Isolierung mittels RNeasy®Plus Mini Kit.....	35
2.2.1.1.3. Synthese der cDNA .....	35
2.2.1.1.4. Hot-Start-Polymerasekettenreaktion.....	37
2.2.1.1.5. Elektrophoretische Auftrennung der DNS im Agarosegel.....	39
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden.....	39
2.2.2.1. Westernblot .....	39
2.2.2.1.1. Proteinextraktion und Proteinaufarbeitung .....	40
2.2.2.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford .....	41
2.2.2.1.3. Herstellung des Trenn- und Sammelgels .....	43
2.2.2.1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli .....	43
2.2.2.1.5. Halbtrockener Membran-Transfer.....	44
2.2.2.1.6. Immunologischer Antigen Nachweis mittels Chemilumineszenz ...	45
2.2.2.2. Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	46
2.2.3. Sonstige Methodik .....	47
2.2.3.1. Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assay mittels Kristallviolett-Färbung .	47
2.2.3.2. Gewinnung und Lagerung des konditionierten Mediums .....	48

2.2.3.3. Laktatbestimmung im konditionierten Medium.....	48
2.2.3.4. Gamma-Bestrahlung.....	48
2.2.3.5. Auswertung und Statistik .....	49
3. Ergebnisse .....	50
3.1. Molekulargenetisches PD-L1 und CTLA-4 Screening diverser Tumorentitäten ..	50
3.2. Gammabestrahlung hat keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression.....	53
3.3. Im Medium enthaltene Stoffe, nicht aber zunehmende Zelldichte oder Apoptose, induzieren PD-L1 .....	54
3.4. Behandlung mit konditioniertem Medium führt zur PD-L1-Induktion .....	56
3.5. Einfluss von Signalweghemmstoffen auf die durch die Behandlung von konditioniertem Medium induzierte PD-L1-Expression .....	57
3.6. Funktionskontrolle der Signalweginhibitoren.....	62
3.7. Untersuchung des konditionierten Mediums .....	63
3.7.1. Auf die Laktatkonzentration .....	64
3.7.2. Auf die Konzentration von anderen Signalbotenstoffen .....	65
3.8. Einfluss von IL-8, IL-6, CXCL-1 und Laktat auf das PD-L1-Expressionslevel .....	66
3.8.1. Induktion von PD-L1 durch IL-8, IL-6, CXCL-1 und Laktatbehandlung .....	66
3.8.2. Beeinflussung des PD-L1-Levels durch die Behandlung mit IL-8, IL-6 und CXCL-1 neutralisierenden Antikörpern .....	68
3.8.3. Beeinflussung der PD-L1-Expression durch die Behandlung mit dem allosterischen CXCR1/2 Rezeptor-Antagonist <i>Navarixin</i> .....	70
3.9. PD-L1-Induktion durch Interferon-gamma via STAT1 Signalweg.....	71
3.10. Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays .....	73
3.11. Ausblick: Medikamentöse Beeinflussung des PD-L1-Expressionslevels .....	75
4. Diskussion.....	77
4.1. Die konstitutive und induzierbare PD-L1-Expression .....	77

4.1.1. Die konstitutive PD-L1-Expression.....	77
4.1.2. Die induzierbare PD-L1-Expression.....	78
4.1.2.1. Bedeutung des konditionierten Mediums.....	79
4.1.2.2. Bedeutung von Gamma-Strahlung .....	79
4.1.2.3. Bedeutung von Zytokinen .....	80
4.1.2.3.1. Die besondere Bedeutung von Interleukin-8 (IL-8, CXCL-8) .....	81
4.1.2.4. Bedeutung der endogenen Laktatproduktion .....	84
4.1.2.5. Bedeutung von Interferon-gamma .....	86
4.2. Die besondere Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs .....	88
5. Zusammenfassung.....	89
5.1. Ausblick.....	91
6. Abbildungsverzeichnis .....	92
7. Tabellenverzeichnis .....	93
8. Literaturverzeichnis .....	94
9. Danksagung.....	104

## Abkürzungsverzeichnis

<sup>131</sup> I	<sup>131</sup> Iod
AKT	Proteinkinase B
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CEA	Carcinoembryonales Antigen
cMET	Hepatozyten-Wachstumsfaktor-Rezeptor
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DALYs	Disability-adjusted life years; krankheitskorrigierte Lebensjahre
ddH <sub>2</sub> O	Bidestilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
dsDNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinases
EtOH	Ethanol
HCl	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase
IFN-γ	Interferon-gamma
IL-10	Interleukin-10
IL-4	Interleukin-4
IL-6	Interleukin-6

IL-8.....	Interleukin-8
in toto .....	Im Ganzen
in vitro .....	Im Glas; Untersuchungen außerhalb eines lebenden Organismus
in vivo.....	Im Lebendigen; Untersuchungen am lebenden Organismus
IRF .....	Interferon-Regulationsfaktor
JAK .....	Januskinase
KCl.....	Kaliumchlorid
MAPK.....	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MEN2 .....	Multiple endokrine Neoplasie Typ 2
MeOH.....	Methanol
MgCl <sub>2</sub> .....	Magnesiumchlorid
MHC.....	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
miRNAs.....	Mikro-Ribonukleinsäuren
mRNA .....	Boten-Ribonukleinsäure
MRT .....	Magnetresonanztomographie
mTOR .....	Mammalian Target of Rapamycin, Ziel des Rapamycins im Säugetier
NaOH.....	Natronlauge
NCBI .....	Nationales Zentrum für Biotechnologieinformation
NF-κB.....	nukleärer faktor kappa b
NIS.....	Natrium-Iodid-Symporter
PARP .....	Poly(ADP-ribose)-Polymerasen
PCR .....	Polymerase-Kettenreaktion
PD-L1.....	programmed cell death 1 ligand 1
Pen/Strep .....	Penicillin-streptomycin
PI3K .....	Phosphoinositid-3-Kinasen
RNA .....	Ribonukleinsäure
RT .....	Reverse Transkriptase
SDS.....	Natriumlaurylsulfat
STAT .....	Signal transducer and activator of transcription
TAE .....	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS .....	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST.....	TBS-Tween

TEMED .....	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylendiamin
TG-AK .....	Thyreoglobulin-Autoantikörper
TME .....	Tumor microenvironment; Tumormikroumgebung
TPO-AK.....	Thyreoperoxidase-Autoantikörper
TRAK .....	Thyreotropin-Rezeptor-Autoantikörper
Tris .....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH.....	Thyroidea stimulierendes Hormon
UICC .....	Union for International Cancer Control; Internationale Vereinigung gegen Krebs
UV/VIS-Spektroskopie .....	Elektronenabsorptionsspektroskopie
VEGF .....	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor

## 1. Einleitung

### 1.1. Das Schilddrüsenkarzinom

#### 1.1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Das Schilddrüsenkarzinom ist das häufigste Malignom des endokrinen Systems (Laha et al., 2020). In den letzten Jahren zeigte sich weltweit ein signifikanter Anstieg ihrer Inzidenz (Bonfond und Davies, 2014; Hundahl et al., 2000; Seib und Sosa, 2019). Im Jahr 2018 erkrankten etwa 4.270 Frauen und 1.930 Männer in Deutschland neu an einem Schilddrüsenkarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter betrug bei Frauen 51 Jahre sowie bei Männern 56 Jahre und lag damit im Vergleich zu anderen Krebsarten relativ niedrig (Deutsches Krebsregister). Vor allem in der Alterskohorte von jungen Frauen unter 40 Jahren ist die Inzidenz von Schilddrüsenkarzinomen stark gestiegen. In dieser Alterskohorte gehört es mittlerweile neben dem Mammakarzinom zu den häufigsten Tumorerkrankungen (Follmann, 2018). Die ansteigenden Fallzahlen werden zwar unter anderem auf bessere und häufigere Screening-Untersuchungen zurückgeführt, nichtsdestotrotz ist auch ein realer Anstieg der Erkrankung anzunehmen (Seib und Sosa, 2019). Es gibt eine Reihe von gesicherten Risikofaktoren für die Entstehung von Schilddrüsenkarzinomen. Die familiäre Prädisposition spielt eine wichtige Rolle (Prete et al., 2020): Autosomal dominant vererbte Rearrangements des RET-Protoonkogens wurden in einer Reihe von Schilddrüsenkarzinom-Subtypen gefunden (Salvatore et al., 2021). Schilddrüsenkarzinome können auch im Rahmen von erblichen Syndromen, wie der autosomal-dominant vererbten multiplen endokrinen Neoplasie Typ 2 (MEN2) auftreten (Accardo et al., 2017). Eine wichtige direkte Ursache des Schilddrüsenkarzinoms ist die Exposition der Schilddrüsenloge mit ionisierender Strahlung, insbesondere in der Kindheit (Iglesias et al., 2017). Allen voran sind hier medizinische Anwendungen mit Strahlenbelastung, wie Röntgen oder CT-Scans, oder eine direkte Bestrahlung der Kopf-Hals-Region, zu nennen. Aber auch die Aufnahme von radioaktivem Jod in Regionen mit radioaktivem Fallout, wie z. B. 1986 im Rahmen der Nuklearkatastrophe von Tschernobyl, sind von Bedeutung. Die Schilddrüse ist in diesem Fall besonders exponiert, da sie über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) verstärkt das entstehende Radioisotop  $^{131}\text{I}$  einschleust und anreichert. Auch vorbekannte Schilddrüsenerkrankungen, wie etwa ein benignes Struma, ein klinisch relevantes

Schilddrüsenadenom oder eine chronische Inflammation der Schilddrüse, z.B. im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, gelten als Risikofaktoren (Feldt-Rasmussen, 2020; Kitahara et al., 2018; Papanastasiou et al., 2019). Ein niedriger sozialer Status und ein erhöhter body mass index (BMI) erhöhen ebenfalls die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung. Interessanterweise scheint eine positive Raucheranamnese die Auftretenswahrscheinlichkeit von malignen Neoplasien der Schilddrüse zu verringern (Myung et al., 2017).

### 1.1.2. Einteilung, Klinik und Diagnostik

Das Schilddrüsenkarzinom wird hauptsächlich in vier verschiedene histologische Subtypen eingeteilt: Papillär (80-90 %), follikulär (5-10 %), medullär (bis zu 10 %) und anaplastisch (3-5 %) (Katoh et al., 2015). Das differenzierte Schilddrüsenkarzinom (DTC) untergliedert sich in das papilläre Schilddrüsenkarzinom (PTC) und das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (FTC). Seltenerer Typen stellen das medulläre Schilddrüsenkarzinom (MTC), welches von den parafollikulären C-Zellen ausgeht, und das anaplastische Schilddrüsenkarzinom (ATC) dar. Das MTC zählt aufgrund seiner Sekretion von Calcitonin zu den neuroendokrinen Tumoren.

Die Klinik bei Schilddrüsenkarzinomen kann abhängig von der Tumorart und dem Tumorstadium sehr unterschiedlich ausfallen. Oft gibt es außer einem derb und schmerzlos zu tastenden Knoten keine Frühsymptome. Der Verdacht auf ein Schilddrüsenkarzinom wird dann als reiner Zufallsbefund mittels Sonographie gestellt. Durch die enge anatomische Lagebeziehung der Schilddrüse zu Ösophagus, Trachea und Larynx sind die Spätsymptome bei infiltrativem oder verdrängendem Wachstum mannigfaltig: Dysphagie, Dyspnoe, Husten, Stridor, obere Einflusstauung, oder Lymphknotenvergrößerungen sind mögliche Symptome. Außerdem kann es durch eine Parese des N. laryngeus recurrens zu Heiserkeit kommen.

Die Diagnostik des Schilddrüsenkarzinoms fußt auf mehreren Säulen. Zunächst erfolgt eine gründliche Anamnese: Die in Kapitel 1.1.1 genannten Risikofaktoren werden eruiert und eventuell bestehende B-Symptomatik wird abgefragt. An die Anamnese schließt sich eine Tastuntersuchung der Schilddrüse an, die wiederum von einer Schilddrüsenultraschalluntersuchung komplettiert wird. In der Ultraschalluntersuchung sind rasch

größenprogrediente, unregelmäßig begrenzte, echoarme Schilddrüsenknoten mit Mikroverkalkungen und organüberschreitendem Wachstum suspekt. Die Größenbestimmung der Schilddrüse und das Perfusionsmuster des Knotens in der Farbduplexsonographie können den Verdacht erhärten und geben wichtige Hinweise auf differentialdiagnostisch bedeutsame Erkrankungen, wie einen Morbus Basedow oder einer Hashimoto Thyreoiditis. Suspekt ist in der farbduplexsonographischen Untersuchung eine verstärkte Perfusion, insbesondere wenn sie das Knotenzentrum betrifft. Ergänzend findet anschließend eine Blutuntersuchung statt. Die Schilddrüsenfunktionsparameter TSH,  $fT_3$  und  $fT_4$  zählen zur Basisdiagnostik und werden deshalb fast immer mitbestimmt. Je nach Verdachtsdiagnose können zusätzliche spezifischere Parameter hinzukommen, wie das Calcitonin, CEA und Chromagranin-A bei V.a. medulläres Schilddrüsenkarzinom. TSH-Rezeptorantikörper (TRAK), Thyreoperoxidase-Antikörper (TPO-AK) und Thyreoglobulin-Antikörper (TG-AK) werden bei V.a. Morbus Basedow oder Hashimoto-Thyreoiditis mitbestimmt. Wenn sich anschließend in der Gesamtschau der Verdacht auf ein Schilddrüsenkarzinom erhärtet, sollte zur weiteren Abklärung eine Schilddrüsenszintigraphie erfolgen. Bei dieser Untersuchung wird dem Patienten über eine Vene das radioaktive Radionuklid Natrium- $^{99m}\text{Tc}$ -Pertechnetat ( $\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$ ) verabreicht, welches sich je nach Stoffwechselaktivität unterschiedlich im Schilddrüsengewebe anreichert. Knoten, die in der Szintigrafie „kalt“ erscheinen, also kein oder nur wenig Radionuklid anreichern, sind in Zusammenschau mit einem echoarmen Korrelat im Ultraschall hochgradig malignomverdächtig. Solche auffälligen Knoten sollten ab einer Größe von 2 cm mittels interventioneller Feinnadelpunktion und Aspirationszytologie mikroskopisch und histologisch abgeklärt werden. Bei bestätigtem Verdacht ist eine Ausbreitungsdiagnostik indiziert. Hierzu kommen verschiedene bildgebende Verfahren, wie das Röntgen-Thorax, die Abdomensonografie, die Knochenszintigrafie, sowie CT und MRT in Betracht.

### 1.1.3. Therapie, Prognose und Nachsorge

Das Therapiekonzept ist abhängig von Art und Stadium des Schilddrüsenkarzinoms und muss für jeden Patienten individuell gefunden werden. Schwierige Fälle werden interdisziplinär in sogenannten Tumorboards besprochen. In diesen Fallbesprechungen

ist sowohl die Expertise von Onkologen als auch von Chirurgen und Nuklearmedizinern gefragt, um dem Patienten abschließend einen gemeinsam gefundenen Therapievorschlagn unterbreiten zu können. Grundsätzlich unterscheidet man die kurative Therapie von der palliativen Therapie. Während bei der kurativen Therapie restitutio ad integrum das Ziel ist, geht es bei der palliativen Therapie um einen möglichst langsamen, schmerzarmen Progress der Erkrankung und einen langen Erhalt von Lebensqualität. Eine vollständige Heilung ist hier nicht mehr das Ziel. Die Standardtherapie des kurativen Schilddrüsenkarzinoms ist die komplette operative Thyreoidektomie mit zentraler Lymphknotendissektion (Ambrosetti et al., 2009). Postoperativ findet bei differenzierten Schilddrüsenkarzinomen zur Zerstörung der makroskopisch nicht sichtbaren Tumorreste und der möglicherweise vorhandenen okkulten Mikrometastasen häufig eine Radiojodtherapie mit dem Jod-Isotop  $^{131}\text{I}$  statt. Da dieses Radioisotop vor allem von Schilddrüsengewebe aufgenommen wird und die ausgesandte  $\beta$ -Strahlung eine Reichweite von wenigen Millimetern hat, wirkt die von  $^{131}\text{I}$  emittierte Strahlung vor allem lokal im Schilddrüsenrestgewebe und schont gesundes Gewebe des restlichen Gesamtkörpers. Dem undifferenzierten und medullären Schilddrüsenkarzinom ist diese Therapieform nicht zugänglich, da sie kein  $^{131}\text{I}$  aufnehmen und anreichern können. Hier ist es umso wichtiger, den Tumor und die befallenen Lymphknoten operativ in vivo und in toto zu entfernen. Neben den bisher genannten Therapien gibt es noch eine Reihe weiterer Therapiemöglichkeiten: Adjuvante externe Strahlentherapie, Chemotherapie und Tyrosinkinase-Inhibitoren. Diese Therapieformen sind nicht zuletzt wegen ihrer zum Teil ausgeprägten Nebenwirkungen den therapierefraktären und aggressiven Tumoren im Spätstadium vorbehalten.

Die Prognose maligner Schilddrüsenerkrankungen ist mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 95 % bei Frauen und 91 % bei Männern im Allgemeinen gut. Zwar wird die Mehrzahl der Schilddrüsenkarzinome in einem Frühstadium entdeckt, aber rund 16 % bei Frauen und 35 % bei Männern werden bei Erstdiagnose dem Stadium III oder IV nach UICC zugeordnet. Weltweit zeigte sich in den letzten Jahren in Australien, Dänemark und den USA eine ungünstige Erhöhung der Mortalität und eine Erhöhung der disability-adjusted life years (DALYs) in Bezug auf maligne Schilddrüsenerkrankungen (Schuster-Bruce et al., 2022). Die 5-Jahres-Überlebensrate von selteneren Subtypen, wie dem medullären, oder anaplastischen Schilddrüsenkarzinom ist äußerst schlecht. Sie beträgt beim

medullären Schilddrüsenkarzinom gerade einmal 60-70 % und beim anaplastischen Karzinom sogar unter 10 % (Deutsches Krebsregister). Damit zählt das anaplastische Schilddrüsenkarzinom zu den aggressivsten und bösartigsten Tumoren überhaupt. Die Prognose hängt insgesamt von vielen verschiedenen Einflussfaktoren ab. Ungünstig ist im Allgemeinen ein Alter des Patienten von über 45 Jahren, eine große Tumorgroße, eine stattgehabte Fernmetastasierung, eine ausgeprägte Gefäßinvasion oder eine Infiltration des Tumors in anatomisch benachbarte Strukturen (Kato et al., 2015).

Da das Schilddrüsenkarzinom zu Spätrezidiven neigt, ist eine regelmäßige und lebenslange Nachsorge sehr wichtig (Schlumberger und Leboulleux, 2021). Neben engmaschigen sonographischen Untersuchungen ist auch eine Laboruntersuchung des Bluts im Rahmen der Nachsorge sinnvoll. Thyreoglobulin ist ein Protein, das ausschließlich von Schilddrüsenzellen gebildet wird. Nach Operation und Ablation der Schilddrüse darf dementsprechend kein Thyreoglobulin mehr im Blut nachweisbar sein. Ein Anstieg des Thyreoglobulins oder der Tg-AK spricht dann für das Wiederauftreten eines Schilddrüsenkarzinoms. Ein Anstieg von Calcitonin spricht, wie auch bei der initialen Diagnostik, für das (Wieder)auftreten eines medullären Schilddrüsenkarzinoms. Durch eine operative (Teil-)Resektion oder die Radiojodtherapie kann die endogene Bildung von lebenswichtigen Schilddrüsenhormonen so weit eingeschränkt werden, dass eine exogene Substitution dieser Hormone notwendig wird. Die richtige Einstellung auf diese gehört ebenfalls zur Nachsorge. Die Dosis wird entsprechend an die im Blut bestimmbaren Schilddrüsenfunktionsparameter TSH, fT<sub>3</sub> und fT<sub>4</sub> angepasst.

## 1.2. Neue Therapieoptionen für das fortgeschrittene Schilddrüsenkarzinom

Durch das fortschreitende Verständnis der Pathogenese von Schilddrüsenkarzinomen auf molekularer Ebene haben sich in den letzten Jahren einige vielversprechende neue Therapiekonzepte entwickelt. Durch molekulare und immunologische Testung des Tumorgewebes können ebensolche individuellen Therapiekonzepte ausgewählt werden, die in die Signaltransduktion von nachgewiesenen biologischen und zytologischen Mutationen eingreifen. Diese personalisierten, zielgerichteten Behandlungen werden deswegen auch als „targeted therapies“ bezeichnet und haben die Medizin in den letzten Jahren revolutioniert sowie an Bekanntheit gewonnen. Über die zielgerichtete Therapie

des Schilddrüsenkarzinoms sind bereits viele Aspekte bekannt. Welchen Einfluss ein Eingreifen in die fehlgeleiteten Signalwege auf die Expression des immunsuppressiven Proteins PD-L1 hat, ist jedoch noch ungeklärt.

### 1.2.1. Blockade dysregulierter, onkogener Signalwege

Mutierte und dadurch fehlerhaft konstitutiv aktive, intrazelluläre Signalwege verleihen Tumoren bösartige Eigenschaften und sind schon seit einiger Zeit Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen mithilfe von Medikamenten (Thomas et al., 2015). In dieser Arbeit soll dieses Paradigma anhand drei verschiedener Signalwege betrachtet werden: Dem MAPK/ERK Signalweg, dem PI3K/AKT/mTOR Signalweg und dem JAK-STAT-Signalweg.

Der MAPK/ERK-Signalweg ist in 30 % der Karzinome hyperaktiviert (Garnett und Marais, 2004). Beim Schilddrüsenkarzinom führen die BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation, die RAS-Mutation und die Rearrangements des RET-Protoonkogens bewiesenermaßen zu einem konstitutiv aktiven MAPK/ERK-Signalweg (Inigo et al., 2016; Laha et al., 2020). In über 80 % der papillären Schilddrüsenkarzinome findet sich eine veränderte Genetik des MAPK/ERK-Signalwegs (Antonelli et al., 2008). Der MAPK/ERK-Signalweg kontrolliert verschiedene Zellfunktionen, wie die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Zellmotilität und den Zelltod (Cargnello und Roux, 2011). Eine multizentrische Phase-I-Studie und eine multizentrische Phase-II-Studie konnten für den BRAF<sup>V600E</sup>-Inhibitor Vemurafenib ein Ansprechen auf die Therapie beim radiojodrefraktären, metastasierten Schilddrüsenkarzinom zeigen (Brose et al., 2016; Kim et al., 2013). Einen ähnlichen Effekt zeigten auch andere Inhibitoren dieses Signalwegs, wie Dabrafenib (Rothenberg et al., 2015) oder Selumetinib. Letzterer erhöhte sogar die Radiojodaufnahme des fortgeschrittenen Schilddrüsenkarzinoms, was für eine Assoziation zwischen dem überaktiven MAPK/ERK-Signalweg und der fehlenden Ansprechbarkeit auf die Radiojodtherapie spricht (Ho et al., 2013).

Ebenfalls konnte für das anaplastische Schilddrüsenkarzinom gezeigt werden, dass es durch eine hohe Mutationslast eine Vielzahl verschiedener Tumoronkogene aufwies, wie dem TP53, dem TERT-Promoter und dem PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (Inigo et al., 2016). Dieser Signalweg aktiviert und moduliert die Funktion verschiedenster Substrate, die für die Regulation von Zellüberleben, Zellzyklus-Progression, Zellwachstum,

Angiogenese und Zellmigration verantwortlich sind (Fresno Vara et al., 2004). In den letzten Jahren konnte für verschiedene Tumorentitäten gezeigt werden, dass Veränderungen dieses Signalwegs für eine Strahlen- und Chemotherapieresistenz von Tumoren verantwortlich sind (Fresno Vara et al., 2004). Auch für das Schilddrüsenkarzinom konnte gezeigt werden, dass genetische und epigenetische Veränderungen des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs zur konstitutiven Aktivierung desselben führen (De Leo et al., 2020). Die beteiligten Proteine des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs können durch verschiedene Mutationen aktiviert werden: BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation, PI3K-Mutation, Rearrangements des RET-Protoonkogens, oder die Reduktion bzw. der Verlust des Tumorsuppressors PTEN (Saji und Ringel, 2010). Dies wiederum führt zu einer verstärkten Angiogenese, Chemotherapieresistenz, Progression, sowie Metastasierung des Schilddrüsenkarzinoms (Laha et al., 2020). Inhibition dieses Signalwegs mittels des mTOR-Inhibitors Everolimus zeigte sowohl in vitro als auch in vivo eine Hemmung des Tumorwachstums verschiedener Schilddrüsenkarzinom Zelllinien (Owonikoko et al., 2019).

Der JAK-STAT-Signalweg hat sowohl Einfluss auf das Tumorwachstum als auch auf die Anpassung und Veränderung der Tumormikroumgebung (TME). Präklinisch hat sich in Zellkulturstudien und Mausmodellen gezeigt, dass eine Inhibierung des JAK-STAT-Signalwegs zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation und einer Erhöhung der Apoptose von Tumorzellen führt. Eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalwegs ist dementsprechend mit einer ungünstigen Prognose verknüpft und ein interessanter therapeutischer Ansatzpunkt (Thomas et al., 2015). Der JAK-STAT-Signalweg ist außerdem maßgeblich an der Signaltransduktion von an Zytokinrezeptor bindenden Zytokinen, also Interferonen und Interleukinen, verantwortlich. Die erhöhte autokrine Produktion von Zytokinen durch die Tumorzellen kann zu einer Induktion dieses Signalwegs führen. So hat sich beispielsweise beim Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinom gezeigt, dass durch autokrine Produktion von IL-6 durch die Tumorzellen der STAT-3 Signalweg vermehrt aktiviert wurde (Sriuranpong et al., 2003). Auch für eine Aktivierung des STAT1 durch Interferone konnte mehrfach gezeigt werden, dass diese durch Hochregulation von immunsuppressiven Proteinen sich vor dem Immunsystem maskieren und diesem im Vorgang der Immunevasion entgehen können (Cerezo et al., 2018; Sasidharan Nair et al., 2018).

## 1.3. Immuntherapie mittels Immuncheckpoint-Inhibitoren

### 1.3.1. Grundlagen des Immunsystems

Eine immunkompetente T-Zelle bindet ihr spezifisches Antigen präsentiert über MHC-Komplexe antigenpräsentierender Zellen über den T-Zell-Rezeptor. Parallel zu dieser Hauptbindung, kommt es auch zur Bindung von costimulatorischen und coinhibitorischen Rezeptoren, die sowohl von den T-Zellen als auch von der gebundenen Zielzelle exprimiert werden. Erst das Binden von Corezeptoren ermöglicht es der T-Zelle, auf Grundlage der Gesamtheit aller eingehenden Signale zu entscheiden, ob eine Immunantwort ausgelöst wird oder ausbleibt. Das Koexistieren von pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Signalen bildet im gesunden Menschen die Grundlage der peripheren Immuntoleranz (Bardhan et al., 2016). Tumorzellen regulieren auf ihrer Zelloberfläche häufig gezielt immunsuppressive Proteine wie PD-L1 hoch, um sich so vor dem Immunsystem zu maskieren und diesem zu entgehen: Nach Bindung der Tumorantigene bleibt durch eine PD-L1 ausgelöste T-Zell Anergie eine Immunantwort aus, womit es letztendlich in der Gesamtheit zu einer nachlassenden anti-Tumor Aktivität kommt. Diesen Prozess bezeichnet man als Immun- oder Tumorevasion. So korreliert beispielsweise der Grad an PD-L1-Positivität von PTCs mit einem höheren Rezidivrisiko und einem reduzierten krankheitsfreien Überleben (Ferrari et al., 2019).

### 1.3.2. Zelluläre Regulationsmechanismen des Immuncheckpoints PD-L1

Die Bedeutung des MAPK/ERK-Signalwegs, des PI3K/AKT/mTOR-Signalwegs und des JAK-STAT-Signalwegs im Rahmen der Onkogenese von Schilddrüsenkarzinomen wurden in Kapitel 1.2.1 bereits herausgearbeitet. Die Auswirkung dieser Signalwege auf die Expression des immunsuppressiven Proteins PD-L1 auf Schilddrüsenkarzinomzellen sind noch unbekannt. Für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise für das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom, das kolorektale Karzinom, oder das Mammakarzinom, ist eine Korrelation dieser Signalwege mit der PD-L1-Expression beschrieben (Almozyan et al., 2017; Stutvoet et al., 2019; Zhao et al., 2020). Es ist allerdings von großer Bedeutung, diese Regulationsmechanismen auch beim Schilddrüsenkarzinom besser zu verstehen,

da das PD-L1-Expressionslevel der entscheidende Prädiktor für das Ansprechen auf eine Immuntherapie ist.

### 1.3.3. Immun- und Kombinationstherapien als Hoffnungsträger

Durch medikamentöse Blockade der immunsuppressiven Proteine mittels monoklonaler Antikörper können zuvor ausgelöste coinhibitorische Signale neutralisiert werden, und so schlussendlich das Gleichgewicht der Immunantwort wiederhergestellt werden. Die Therapie der Immuncheckpoint-Blockade, auch als Immuntherapie bezeichnet, wird schon bei einer Reihe von Tumorerkrankungen erfolgreich eingesetzt, wie z.B. beim malignen Melanom oder kleinzelligen Lungenkarzinom. Eine wichtige belegte These, auf der diese Arbeit grundlegend aufbaut, ist die, dass Patienten, deren Tumore eine hohe PD-L1-Expression aufweisen, ein besseres Ansprechen auf eine PD-L1-Immuntherapie aufweisen und damit einhergehend ein verbessertes Gesamt- und progressionsfreies Überleben haben (Borghaei et al., 2015; Fehrenbacher et al., 2016; Robert et al., 2015; Rosenberg et al., 2016; C. Sun et al., 2018; Weber et al., 2017, 2013, 2015). Diese These ist deshalb von so großer Bedeutung, da sie das Interesse an PD-L1-regulierenden Signalwegen und Substanzen begründet. Wenn sich das PD-L1-Level durch Signalwege, oder durch Substanzen beeinflussen ließe, hätte dies auch einen direkten Einfluss auf den voraussichtlichen Therapieerfolg einer Immuncheckpointblockade. Dabei ist sowohl ein besseres Verständnis von PD-L1 beeinflussenden Faktoren als auch der PD-L1 Signaltransduktion als solcher von großer Bedeutung. Nur so können neue, bessere Therapiekombinationen gefunden werden, die zum einen den interindividuell verschiedenen Veränderungen in der Signaltransduktion und zum anderen der Sinnhaftigkeit einer Kombination verschiedener Therapien Rechnung tragen. Die kombinierten Therapien sollten sich auf molekularer Ebene synergistisch unterstützen. Eine Therapie, die als Nebeneffekt eine Elevation des PD-L1-Expressionslevels bewirkt, könnte beispielsweise gut mit einer Immuncheckpointblockade gegen PD-L1 kombiniert werden.

#### 1.4. Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

Trotz der im Allgemeinen guten Prognose von malignen Schilddrüsenerkrankungen darf die Schwere und Krankheitslast („burden of disease“) dieser Erkrankung nicht unterschätzt werden. Vor allem für Patienten mit fortgeschrittenen, metastasierten und radiojodtherapierefraktären Schilddrüsenkarzinomen gibt es bisher noch keine gute Behandlungsmöglichkeit. Inoperable Rezidive und das anaplastische Schilddrüsenkarzinom sind auch heutzutage noch Erkrankungen mit hoher Letalität und bedeuten für die Betroffenen eine starke Einschränkung der Lebensqualität. Hier ist es die Aufgabe und die Verantwortung der medizinischen Forschung, neue Behandlungsmöglichkeiten mit weniger Nebenwirkungen und hohem Therapieerfolg zu entwickeln, die den Betroffenen eine Lebensperspektive ermöglichen. Einen Beitrag dazu soll diese Arbeit darstellen. Hauptaugenmerk ist dabei vor allem, mannigfaltige Einflussfaktoren auf das PD-L1-Expressionslevel herauszuarbeiten, um damit ein Fundament für weitere Arbeiten und die klinische Forschung zu legen. Diese Arbeit soll einen Überblick darüber verschaffen, welche Faktoren bei den Schilddrüsenkarzinomzelllinien B-CPAP und CAL-62 das PD-L1-Expressionslevel beeinflussen und welche Rolle die Signalwege PI3K/AKT, MAPK/ERK und JAK/STAT in Bezug auf die PD-L1-Expression spielen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Materialien

#### 2.1.1. Geräte, Software und Verbrauchsmaterialien

**Tab. 1:** Geräte

Gerät	Bezugsquelle
Blotting-Kammer (semi-trocken)	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Gelelektrophoresekammer für die Nukleinsäure-Gelelektrophorese GNA-100	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Digitalkamera AxioCam	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Eismaschine	Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Glasplatten für den Westernblot	Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland
Heizblock Uniteq HB 130	Peqlab, Erlangen, Deutschland
HERACELL VIOS 160i CO <sub>2</sub> -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kleine Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
Laborfuge 15R	Heraeus, Hanau, Deutschland
Magnetrührer	VELP Scientifica Srl, Usmate Velate (MB), Italien
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
MiniSpin Plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multigel-Elektrophoresekammer G44	Biometra, Göttingen
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NucleoCounter®NC-200™	ChemoMetec, Kaiserslautern, Deutschland
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Amersham™ Imager 600	GE Healthcare Life Sciences, Solingen, Deutschland
Photometer GeneQuant™	Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

Pipettierhilfe	BRAND GMBH + Co.KG, Wertheim, Deutschland
PTC-0200 DNA Engine® Peltier Thermal Cycler	BioRad, Hercules, USA
Reinwassergerät	stakpure GmbH, Niederahr, Deutschland
Schwenk- und Schüttelgerät	VWR, Part of Avantor, Radnor, USA
SM-LUX Mikroskop	Leitz, Wetzlar, Deutschland
Stickstofftank	Air Liquide S.A., Paris, Frankreich
Tiefkühlgerät -80 °C Modellreihe HFU/HFC	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vakuumpumpe	Hettich Benelux B.V., Geldermalsen, Niederlande
Vortexer	Phoenix Instrument GmbH, Garbsen, Deutschland
Wallac 1420 Victor Photometer	PerkinElmer, Turku, Finnland
Wasserbad	LAUDA Dr. r. Wobser GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zellkulturarbeitsbank	Heraeus Holding GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Mikrowelle	MHA Haushaltswaren GmbH, Barsbüttel, Deutschland

**Tab. 2:** Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
6-Lochplatten	Greiner BioOne: Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
96-Lochplatten	Greiner BioOne: Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Greiner BioOne: Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
Autoklavierte Pipettenspitzen (0,1 µl– 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Teströhrchen (Polypropylen), 15 ml, 50 ml	Greiner BioOne: Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland
Neubauerkammer Deckgläser	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrocellulose (0,45 µm)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Parafilm®	Amtcor, Zürich, Schweiz
Pasteurpipetten	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim, Deutschland

Perfusorspritze 50 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Stabpipetten 10 ml	Greiner BioOne: Greiner AG, Kremsmünster, Österreich
Stabpipetten 5 ml und 25 ml	Corning® Costar® Stripette®: Corning Incorporated, Corning, USA
Sterile, nukleasefreie PCR-Tubes	ratiolab GmbH, Dreieich, Deutschland
Sterile, nukleasefreie Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilfilter 0,2 µm	Cytiva, Marlborough, USA
Whatman-Papier (460 mm x 570 mm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

**Tab. 3:** Software

Software	Bezugsquelle
AxioVision	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
ImageJ Version 1.53r	NIH, Bethesda, MD, USA
Microsoft® Excel Version 2019	Microsoft® Corporation, Redmond, USA
Microsoft® Office Version 2019	Microsoft® Corporation, Redmond, USA
Victor Wallac 1420 Photometer, Software Version 3.0	PerkinElmer, Turku, Finland

### 2.1.2. Chemikalien und Reagenzien

**Tab. 4:** Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Bezugsquelle
10x PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
2x Trypsin	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
5x first strand buffer	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
6-Aminohexansäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Acrylamid-Bis Fertiglösung 30 %	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
APS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

dNTP-Mix	VWR, Part of Avantor, Radnor, USA
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
EDTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FBS)	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Glycin für die Molekularbiologie	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Midori Green Advanced DNA Stain	Nippon Genetics Europe, Düren, Deutschland
PBS	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Phosphataseinhibitorcocktail 2	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Phosphataseinhibitorcocktail 3	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Proteaseinhibitorcocktail	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Random Hexamer Primer	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
RPMI Medium	Gibco: Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS (ultra pure)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Biomol, Hamburg, Deutschland
Tween®20	Merck, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.3. Zytokine und Zytokin neutralisierende Antikörper

**Tab. 5:** Zytokine und Zytokin neutralisierende Antikörper

Protein/Antikörper Name	Einsatz	Bezugsquelle
Interleukin-8 (IL-8)	15 ng/ml	PeptoTech, Cranbury, USA
Interleukin-6 (IL-6)	15 ng/ml	PeptoTech, Cranbury, USA
GRO- $\alpha$ /CXCL-1	15 ng/ml	Cell Guidance Systems, Cambridge, United Kingdom
Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ )	10 ng/ml	PeptoTech, Cranbury, USA
Anti-Interleukin-8 ( $\alpha$ -IL-8)	5 $\mu$ g/ml	R&D Systems, Minnesota, USA
Anti-Interleukin-6 ( $\alpha$ -IL-6)	5 $\mu$ g/ml	R&D Systems, Minnesota, USA
Anti-CXCL-1 ( $\alpha$ -CXCL-1)	5 $\mu$ g/ml	R&D Systems, Minnesota, USA

### 2.1.4. Signalweginhibitoren

**Tab. 6:** Vorklinische Signalweginhibitoren

Inhibitor Name	Inhibiert	Stammlösung	Einsatz	Bezugsquelle
U0126	MEK 1/2	10 mM	20 $\mu$ M	Promega, Wisconsin, USA
MK2206	AKT	1 mM	1 $\mu$ M	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
5,15-DPP	STAT-1/STAT-3	10 mM	1 $\mu$ M-50 $\mu$ M	Cayman Chemical, Michigan, USA
Navarixin	CXCR1/2	10 mM	40 $\mu$ M	MedChemExpress, Monmouth Junction, USA

**Tab. 7:** Klinische Signalweginhibitoren

Inhibitor Name	Inhibiert	Stammlösung	Einsatz	Bezugsquelle
Alpelisib	PI3K	10 mM	10 $\mu$ M	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Everolimus	mTOR	10 mM	10 $\mu$ M	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Sunitinib	Rezeptor-Tyrosinkinasen	50 mM	2,5 $\mu$ M	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA
Capmatinib	c-MET	5 mM	10 $\mu$ M	Targetmol, Wellesley Hills, USA
Ribociclib	CDK	10 mM	10 $\mu$ M	MCE MedChemExpress, Monmouth Junction, USA

Sorafenib	Multikinase-inhibitor	10 mM	10 µM	AdipGen, Füllinsdorf, Schweiz
Capmatinib	cMET	10 mM	10 µM	Selleck Chemicals LLC, Houston, USA

### 2.1.5. Zusammensetzung von Gelen, Puffern und Lösungen

#### **Polymerasekettenreaktion**

##### 50x TAE-Puffer (nach Maniatis)

242 g Tris Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

##### 10x PCR-Puffer

200 mM Tris HCl pH 8,4

500 mM KCl

1ml 50 mM MgCl<sub>2</sub>

##### Agarosegel

1 % Agarose (0,5 g auf 50 ml)

1x TAE-Puffer

Midori Green Advanced (3 µl/50 ml Gel)

100 bp Marker (4 µl/Spur)

#### **cDNA-Synthese**

##### 5x Erststrang-Puffer

250 mM Tris-HCl, pH 8,3

375 mM KCl

15 mM MgCl<sub>2</sub>

#### **Westernblot**

##### 1 M Tris, pH 8,8

60,55 g Tris Base

ddH<sub>2</sub>O ad 500 ml

mit NaOH/HCl auf pH 8,8

##### 1 M Tris, pH 6,8

60,55 g Tris Base

ddH<sub>2</sub>O ad 500ml

mit NaOH/HCl auf pH 8,8

##### 5x SDS Proben-Puffer

15 ml 300 mM Tris-HCl, pH 6,8

5g SDS

25 ml Glycerin

6,25 ml β-Mercaptoethanol

250 µl 1 % Bromphenolblau

ddH<sub>2</sub>O ad 50 ml

##### 10x SDS-PAGE-Laufpuffer

144g Glycin

30,3 g Tris Base

10 g SDS

ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

Ponceau-Lösung

0,2 % w/v Ponceau S  
0,3 % w/v Essigsäure

SDS-PAGE Trenngel 10% Acrylamid

6,67 ml 30 % Acrylamid  
7,47 ml 1 M Tris, pH 8,8  
200 µl 10 % SDS  
ddH<sub>2</sub>O ad 20 ml  
150 µl APS  
50 µl TEMED

Blotpuffer 1, pH 10,4

0,3 M Tris, pH 10,4 (18,17 g/500 ml)  
20 % Methanol (v/v) (100 ml/500 ml)  
ddH<sub>2</sub>O ad 500 ml  
mit NaOH/HCl auf pH 10,4

Blotpuffer 3, pH 9,4

25 M Tris, pH 10,4 (1,5 g/500 ml)  
40 mM 6-Aminohexansäure (2,6 g/500 ml)  
20 % (v/v) MeOH (100 ml/500 ml)  
ddH<sub>2</sub>O ad 500 ml  
mit NaOH / HCl auf pH 9,4

Waschpuffer 1x TBST

100 ml 10x TBS  
1 ml Tween®20  
ddH<sub>2</sub>O ad 1000 ml

10 % SDS

10 g SDS  
ddH<sub>2</sub>O ad 100 ml

SDS-PAGE Sammelgel

1,25 ml 30 % Acrylamid  
1,25 ml 1 M Tris, pH 6,8  
100 µl 10 % SDS  
ddH<sub>2</sub>O ad 10 ml  
100 µl APS  
30 µl TEMED

Blotpuffer 2, pH 10,4

25 M Tris, pH 10,4 (1,5 g/500 ml)  
20 % Methanol (v/v) (100 ml/500 ml)  
ddH<sub>2</sub>O ad 500 ml  
mit NaOH/HCl auf pH 10,4

Solubilisierungspuffer/Lysepuffer

10 mM Tris-HCl  
20 mM NaCl  
10 mM EDTA, pH 7,4  
1 % (v/v) Triton-X 100  
1x Proteaseinhibitor (frisch)  
1x Phosphataseinhibitor 1 (frisch)  
1x Phosphataseinhibitor 2 (frisch)

1x PBS

2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
137 mM NaCl  
2,7 mM KCl

BSA-Blockpuffer

2,5 g Bovines Serumalbumin

TBST ad 50 ml

Magermilch-Blockpuffer

2,5 g Magermilchpulver

TBST ad 50 ml

## 2.1.6. Kommerzielle Fertigsysteme „Kits“ und Assays

**Tab. 8:** Kommerzielle Fertigsysteme „Kits“

Kit	Bezugsquelle
Proteome Profiler™ – Human XL Cytokine Array	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad, Kalifornien, USA

## 2.1.7. Enzyme und Größenstandards

**Tab. 9:** Enzyme und Größenstandards

Enzym/Größenstandard	Bezugsquelle
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
HotStarTaq DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden, Deutschland
RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
100 bp DNA-Leiter für die PCR	Invitrogen™, Karlsruhe, Deutschland
BLUEplus prestained Protein Ladder (10-180 kDa)	Biomol, Hamburg, Deutschland

## 2.1.8. Antikörper für den Westernblot

**Tab. 10:** Primärantikörper für den Westernblot

Bezeichnung	Antigen	Verdünnung	Bezugsquelle	Molekulargewicht des Proteins [kDa]
PD-L1 (E1L3N®) XP® Rabbit mAb	PD-L1 /CD274	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	40-50 kDa
STAT-1 Rabbit mAb	STAT-1	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	84 kDa

Phospho-STAT-1 (Tyr701) (58D6) Rabbit mAb	pSTAT-1	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	84 kDa
STAT-3 (D3Z2G) Rabbit mAb	STAT-3	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	80 kDa
Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP <sup>®</sup> Rabbit mAb	pSTAT-3	1:2.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	80 kDa
p44/42 MAPK (137F5) Rabbit mAb	ERK1/2	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	42 kDa, 44 kDa
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) Rabbit mAb	pERK-1/2	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	42 kDa, 44 kDa
AKT Rabbit mAb	AKT	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	60 kDa
Phospho-Akt (Ser473)(D9E) XP <sup>™</sup> Rabbit mAb	pAKT	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	60 kDa
PARP-1 Rabbit mAb	PARP-1	1:1.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	116 kDa, 89 kDa
GAPDH (14C10) Rabbit mAb	GAPDH	1:2.000	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA	37 kDa

**Tab. 11:** Sekundärantikörper für den Westernblot

Antikörpername	Verdünnung	Bezugsquelle
Goat Anti-Rabbit-HRP	1:10.000	Dianova, Hamburg, Deutschland

### 2.1.9. Oligonukleotid-Primer für die PCR

**Tab. 12:** Oligonukleotid-Primer für die PCR

Primer	Orientierung	Primersequenz	Amplicon Länge [bp]
PD-L1 Primer-Paar 1 (PD-L1-PP1)	Fwd Rev	5' – CTGTCACGGTTCCCAAGGAC – 3' 5' – CTTGTAGTCGGCACCACCAT – 3'	314 bp
PD-L1 Primer-Paar 2 (PD-L1-PP2)	Fwd Rev	5' – ACCTGGCTGCACTAATTGTCT – 3' 5' – TCCAGATGACTTCGGCCTTG – 3'	357 bp
CTLA-4 Primer-Paar 1 (CTLA-4-PP1)	Fwd Rev	5' – CTGAAGACCTGAACACCGCT – 3' 5' – ATCATGTAGGTTGCCGCACA – 3'	303 bp
CTLA-4 Primer-Paar 2 (CTLA-4-PP2)	Fwd Rev	5' – GGCACCTCCAGTGGAAATCA – 3' 5' – ACATTCTGGCTCTGTTGGGG – 3'	321 bp

### 2.1.10. Elektronische Datenbanken

**Tab. 13:** Elektronische Datenbanken

Name	Internetadresse	Verwendungszweck
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	<a href="https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/">https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/</a>	Sequenzinformationen, Sequenzvergleiche, Primerdesign für die PCR
Cellosaurus	<a href="https://web.expasy.org/cellosaurus/">https://web.expasy.org/cellosaurus/</a>	Informationen zu den Zelllinien

### 2.1.11. Zellkultur

#### 2.1.11.1. Zelllinien und Kulturbedingungen

Die Zelllinien, mit denen in dieser Arbeit hauptsächlich gearbeitet wurden, sind die humane, papilläre Schilddrüsenkarzinomzelllinie B-CPAP und die humane, anaplastische Schilddrüsenkarzinomzelllinie CAL-62. Die Zelllinie B-CPAP wurde von Professor G. Brabant (Department of Endocrinology, Christie Hospital, Manchester, UK) zur Verfügung gestellt, wohingegen die Zelllinie CAL-62 vom Leibniz-Institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Deutschland) erhalten wurde. Die B-CPAP Zellen wurden im RPMI-1670 Medium kultiviert, die CAL-62-Zellen im Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Beide Medien wurden mit 10 % fetalem

Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep) supplementiert und das DMEM-Medium zusätzlich mit L-Glutamin (Endkonzentration 2 mM). Die Zelllinien wurden für die Kultivierung in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen aus Polystyrol in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>-Begasung aufbewahrt. Für die Experimente wurden 6-Lochplatten, ebenfalls aus Polystyrol, genutzt. Lediglich für die Bestrahlungsexperimente wurden die o.g. Zellkulturflaschen genutzt. Die Atmosphäre im Inkubator war zusätzlich durch ein integriertes Wasserbad humidifiziert. Die Zellen wurden regelmäßig auf Morphe und Konfluenz geprüft, außerdem wurde das in der Zellkulturflasche enthaltene Medium regelmäßig auf Veränderungen in Farbe und Transparenz untersucht. Alle Arbeitsschritte wurden unter einer Sterilbank mit laminarer Strömung durchgeführt. Des Weiteren waren alle Kunststoffmaterialien steril verpackt, die Glaswaren wurden vor Benutzung autoklaviert und die Lösungen, sowie das konditionierte Medium war/en oder wurde/n steril filtriert. Die Arbeitsfläche der Sterilbank wurde vor und nach Gebrauch jeweils mit 70 % Ethanol gereinigt und die Sterilbank jeweils 15 Minuten im Leerlauf gehalten, bevor sie endgültig ein- bzw. ausgeschaltet wurde.

**Tab. 14:** Referenz der Zelllinien des PD-L1 und CTLA-4 mRNA-Screenings

Zelllinie	Tumorentität	Bezugsquelle/Referenz
HT29	Kolonkarzinom	Fogh, 1977
QGP	Somatostatinom	Iguchi, 1990
A549	Lungenkarzinom, nicht kleinzellig	D. J. Giard, 1972
GLC-36	Lungenkarzinom, kleinzellig	Prof. Dr. L.F.M.H. de Leij, Uni Groningen, Niederlande
(NCI-) H146	Lungenkarzinom, kleinzellig	American Type Culture Collection, Rockville, USA
H1184	Lungenkarzinom, kleinzellig	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
SCLC-24H	Lungenkarzinom, kleinzellig	Dr. H. Lahm, Thoraxklinik, Heidelberg, Deutschland
MCF-7	Mammakarzinom	Soule, 1973
HeLa	Zervixkarzinom	Lacks, 1951
LNCaP	Prostatakarzinom	Wu et. al., 1994
PC3	Prostatakarzinom	Kaighn, 1979
A1207	Glioblastom	Giard et al., 1973

A172	Glioblastom	Giard et al., 1973
SHSY5Y	Glioblastom, Astrozytom Grad III	Biedler, 1973
SKMG-15	Glioblastom	Jennings et al., 1989
SKMG-4	Glioblastom	Jennings et al., 1989
SKMG-5	Glioblastom	Jennings et al., 1989
T98	Glioblastom	Stein, 1979
U178MG	Glioblastom	Dr. A. Waha, Institut für Neuropathologie der Uni Bonn, Bonn, Deutschland
U251	Glioblastom	Osborn et al., 1981
U373	Glioblastom	Ponten, et al., 1968
U87	Glioblastom	Giard et al., 1973
TC620	Oligodendrogliom	Merrill and Matsushima, 1988
FTC-133	Schilddrüsenkarzinom, follikulär	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
SKN-MC	Neuroblastom	Sano et al., 1990
BHY	Orales Plattenepithelkarzinom	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
U266	Plasmozytom	American Type Culture Collection, VA, USA
HL60	Promyeloische Leukämie	Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland
A64-CLS	Adenom aus Glandula submandibularis	Cell Lines Service, Eppelheim, Deutschland

### 2.1.11.2. Kryokonservierung, Auftauen und Passagieren der Zellen

Um der natürlichen Veränderung der Zelllinien im Verlauf von mehreren Passagen entgegenzuwirken, wurden zu Beginn mehrere Kryoröhrchen mit jeweils  $1-2 \times 10^6$  Zellen einer frühen Passage in eiskaltem Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) zunächst über Nacht bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  eingefroren. Nach etwa 24 Stunden wurden sie endgültig im flüssigen Stickstoff gelagert. Nach Überschreiten der Passage 20 einer Zelllinie wurde wieder eine der ursprünglichen frühen Passagen aufgetaut, rekultiviert und mit dieser fortgefahren. Alle zwei bis drei Tage während Kultivierung fand ein Mediumwechsel statt und bei 80-90 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert und gesplittet. Dafür wurden die Zellen, nachdem das alte Medium der Zellen aspiriert und verworfen wurde, zunächst mit 5 ml

DPBS gewaschen. Dieses wurde dann ebenfalls aspiriert, verworfen und die Zellen mit 2 ml 2x Trypsin für 2-5 Minuten im Inkubator inkubiert, bis sie sich mikroskopisch abgerundet und bei leichtem Klopfen vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst haben. Anschließend wurde das Trypsin mittels Zugabe von 8 ml frischem Medium neutralisiert und die Zellsuspension für 4 Minuten bei 200 xg abzentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde dann verworfen und das Zellpellet mit 10 ml frischem Medium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl der Suspension [Zellen/ml] mittels Neubauer Zählkammer oder NucleoCounter®NC-200™ bestimmt und entsprechende Volumina in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Molekularbiologie

#### 2.2.1.1. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1987 von Kary Mullis entwickelt, der dafür 1993 den Nobelpreis erhielt. Die PCR hat sich im Laufe der Zeit zu einer der wichtigsten molekularbiologischen Methoden entwickelt. Sie stellt eine in-vitro-Methode dar und dient der spezifischen Amplifikation und Aufreinigung einer DNA-Sequenz. Der eigentlichen PCR gehen einige Schritte voraus: Das Primerdesign, die RNA-Isolierung aus den Zelllysaten und die cDNA-Synthese. Auf all diese Schritte soll im Folgenden eingegangen werden.

##### 2.2.1.1.1. PD-L1 und CTLA-4 Primerdesign

Die Primer legen den Startpunkt der DNA-Replikation fest und führen damit, falls deren spezifische Gensequenz im Ansatz vorhanden ist, zur dessen exponentieller Amplifikation. Um eine hohe Funktionalität der Primer zu gewährleisten, ist es wichtig, dass diese spezifisch für die gesuchte Gensequenz sind. Diese sollte dementsprechend so gewählt werden, dass sie möglichst wenige Überschneidungen mit anderen Genen hat. Außerdem sollten die synthetischen Primer eine ähnliche Annealingtemperatur aufweisen, in der Regel 16-25 Nukleotide lang sein und nicht zur Primer-Dimerisierung neigen. Nach diesen Regeln wurden die Primer dieser Arbeit mithilfe des Programms Primer 3 entworfen. Die passende humane mRNA-Sequenz für das PD-L1/CD274 und

CTLA-4-Gen wurde der Online-Datenbank der National Library of Medicine des National Institut of Health entnommen. Um die statistische Signifikanz zu erhöhen, wurden pro Gen zwei verschiedene Primerpaare entworfen.

#### 2.2.1.1.2. RNA Isolierung mittels RNeasy®Plus Mini Kit

Zunächst wurden die Zellen wie üblich mit Lysepuffer und Zellschaber lysiert und mittels QIAshredder® homogenisiert. Anschließend wurde die RNA mittels RNeasy® Plus Mini Kit nach dem Herstellerprotokoll isoliert. Dafür wurde das Lysat nach Zugabe von Ethanol bei 8.000 xg durch eine RNeasy Säule abzentrifugiert. Das Ethanol unterstützt die RNA dabei, an die Silicagel-Membran zu binden. Alle weiteren Inhaltsstoffe des Lysats werden nicht von der Silicagel-Membran gebunden und als Durchfluss ausgewaschen und verworfen. Anschließend wurden einige Waschschrirte durchgeführt und schließlich der RNeasy spin-Einsatz mit der Silicagel-Membran, die weiterhin die RNA gebunden hat, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nun wurde die RNA mittels RNase-freiem Wasser und weiterer Zentrifugation bei 8.000 xg von der Membran eluiert und im neuen Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurde die Konzentration und Integrität der RNA durch spektralphotometrische Messung verifiziert. Dazu wurde mithilfe von GeneQuant™ die Absorption der Nukleinsäuremischung bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm ( $OD_{260}$ ) und  $\lambda=280$  nm ( $OD_{280}$ ) in einer Quarzküvette bestimmt. Eine  $OD_{260}$  von 1 entspricht dabei 50  $\mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger dsDNA, 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA und 33  $\mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA (Sambrook et al., 2006). Die Konzentration der RNA kann demnach mit folgender Formel berechnet werden:

$$40 \times OD_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \mu\text{g RNA/ml}$$

Neben der Konzentration lässt sich durch das Verhältnis von  $OD_{260}$  zu  $OD_{280}$  eine Aussage zur Reinheit der RNA treffen. Ist das Verhältnis größer gleich 2, spricht dies für eine reine RNA-Isolierung.

#### 2.2.1.1.3. Synthese der cDNA

Für die qualitative Bestimmung der Genexpression mittels PCR wird DNA benötigt. Dementsprechend muss die zuvor isolierte RNA in eine komplementäre DNA (complementary DNA = cDNA) übersetzt werden. Dafür wird das Enzym reverse

Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, benötigt. Die RT synthetisiert aus RNA und DNA-Bausteinen, sogenannten dNTPs jeweils komplementäre DNA-Einzelstränge. Es wurde nach dem SuperScript™ III Reverse Transcriptase-Protokoll des Herstellers vorgegangen. Eingesetzt wurden jeweils exakt 2 µg der zuvor isolierten RNA. Für die Synthese wurden sogenannte Random Hexamer Primer eingesetzt. Hierbei handelt es sich um eine Mischung aus einzelsträngigen Nukleotidsequenzen, die jeweils aus sechs zufällig zusammengesetzten Basenpaaren bestehen. Sie lagern sich der RNA komplementär an und bilden den Startpunkt für die RT. Nach Mischung der Mastermixe wurden diese zunächst für die optimale RNA-Denaturierung für fünf Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend für eine Minute auf Eis gehalten. Danach wurden die jeweiligen Mastermixe mit dem Reaktionsansatz vermischt (Gesamtvolumen jeweils von 20 µl) und zunächst fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben im Thermocycler nach u.a. Programmablaufplan inkubiert. Bei 25°C findet die Primerhybridisierung statt, die eigentliche reverse Transkription findet bei 50°C statt. Das Enzym reverse Transkriptase wird schlussendlich bei 70°C inaktiviert und die Reaktion damit gestoppt. Die fertige cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

**Tab. 15:** Mastermix für die reverse Transkription

Komponente	Menge [µl]
RNA	x µl (2 µg)
Random Hexamer Primer [100 ng/µl]	1 µl
dNTPs [je 10 mM]	1 µl
PCR geeignetes Reinst-H <sub>2</sub> O	ad 12 µl
Total	12 µl

**Tab. 16:** Reaktionsansatz für die reverse Transkription

Komponente	Menge [ $\mu$ l]
5x First Strand Buffer	4 $\mu$ l
0,1 M DTT	2 $\mu$ l
RNaseOUT™ Ribonuklease Inhibitor	1 $\mu$ l
SuperScript™ III Reverse Transkriptase	1 $\mu$ l
Total	8 $\mu$ l

**Tab. 17:** Programmablaufplan der reversen Transkription

Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [min]
65 $^{\circ}$ C	5 min
25 $^{\circ}$ C	10 min
50 $^{\circ}$ C	60 min
70 $^{\circ}$ C	15 min
4 $^{\circ}$ C	$\infty$

#### 2.2.1.1.4. Hot-Start-Polymerasekettenreaktion

Das Prinzip der PCR beruht auf drei Phasen, die als Zyklus temperaturabhängig mehrfach hintereinander ablaufen: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Der Temperaturwechsel zwischen den Teilschritten wird durch ein spezielles Gerät, dem sogenannte Thermocycler, durchgeführt. Ein Thermocycler zeichnet sich dadurch aus, dass er die Umgebungstemperatur des Reaktionsansatzes in wenigen Sekunden auf die phasenspezifische Temperatur ändern kann. Er ist somit eine Art „Schrittmacher“ der PCR. Der erste Schritt, die Denaturierung, führt zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen und zur Trennung des DNA-Doppelstrangs in zwei DNA-Einzelstränge. Im nächsten Schritt, der Primerhybridisierung, flankiert der Forward-Primer seine komplementäre Zielsequenz im Sense-Strang, wohingegen der Backward-Primer die DNA-Matrix an seiner Zielsequenz im Antisense-Strang flankiert. In der folgenden Elongationsphase dienen diese Primer als Startpunkt der Taq-Polymerase, einer thermostabilen ursprünglich aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* extrahierten, DNA-

abhängigen DNA-Polymerase. Dank der Thermostabilität muss die Polymerase nicht nach jedem PCR-Zyklus erneut hinzu pipettiert werden. Die Taq-Polymerase synthetisiert von 3'→5'-Richtung ausgehend vom Primer als Startpunkt eine neue komplementäre und doppelsträngige DNA. Dafür verknüpft sie die zugesetzten DNA-Bausteine, die sogenannten Desoxyribonukleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Der neu entstandene DNA-Strang dient dann wiederum als DNA-Ausgangsmatrix für den nächsten Zyklus. Die PCR zeichnet sich dadurch aus, dass durch die exponentielle Vervielfältigung der DNA auch der Nachweis von DNA-Fragmenten aus kleinsten Mengen Untersuchungsmaterials in kurzer Zeit möglich ist. Die Hot-Start-PCR ist eine leicht abgewandelte, aber in ihren Prinzipien an der klassischen Form der PCR orientierte Methode. Sie zeichnet sich im Vergleich durch weniger unerwünschte und unspezifische Produkte, einer höheren Ausbeute der Zielsequenz, geringerer Primer-Dimerisierung und einer im Allgemeinen höheren Sensitivität und Spezifität aus (Birch et al., 1996). Der verwendete Reaktionsansatz und der Programmablaufplan sind im Folgenden dargestellt.

**Tab. 18:** Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion

Komponente	Stammlösung	Endkonzentration	Menge [µl]
dNTPs [je 10 mM]	10 mM	0,2 mM	0,4 µl
HotStarTaq DNA-Polymerase	5 U/µl	1 U	0,1 µl
PCR-Puffer	10x	1x	2,0 µl
DMSO	-	-	2 µl
cDNA	-	-	1 µl
jeweils up/fwd Primer	10 pmol/µl	0,5 pmol/µl	1 µl
jeweils down/rev Primer	10 pmol/µl	0,5 pmol/µl	1 µl
PCR geeignetes Reinst-H <sub>2</sub> O	-	-	ad 20 µl
total	-	-	20 µl

**Tab. 19:** Programmablaufplan der Polymerasekettenreaktion

Temperatur [°C]	Dauer [min]
95 °C	5 min
94 °C	10 min
60 °C	60 min
72 °C	15 min
72 °C	15 min
4 °C	∞

} x34

### 2.2.1.1.5. Elektrophoretische Auftrennung der DNS im Agarosegel

Die in der PCR vervielfältigte DNA wurde anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nachgewiesen. Im Agarosegel wandern DNA-Moleküle aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, wobei kleinere DNA-Fragmente schneller und damit weiter wandern als größere. Durch die Interkalation des unter UV-Licht fluoreszierenden Midori Green Advance Farbstoffs konnten die DNA-Fragmente mittels UV-Transilluminator sichtbar gemacht und unter Verwendung eines Kamerasystems dokumentiert werden. Mithilfe parallellaufender DNA-Fragmente bekannter Länge konnte schließlich ein Rückschluss auf die Länge und Spezifität des zuvor gewonnenen Amplifikats gezogen werden. Das Agarosegel wurde wie folgt hergestellt: 1 % Agarose wurde unter Kochen in einer Mikrowelle in 1x TAE-Puffer gelöst, kurzzeitig bei Raumtemperatur abgekühlt und dem Ansatz anschließend Midori Green hinzugefügt. Außerdem wurden mithilfe von Kunststoff-Kämmen Taschen geschaffen, in denen später die Proben geladen werden konnten. Die Proben wurden zuvor mit 6x PCR-Ladepuffer, zwecks Verhinderung der Rückdiffusion, versetzt. Der Gellauf fand bei 90 V und maximal 400 mA statt, bis die hellblaue Lauffront mittig angekommen war.

## 2.2.2. Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.2.1. Westernblot

Die Methode des Westernblots besteht aus drei Schritten: Der Gelelektrophorese, dem eigentlichen Blotting und dem Immunoblot. Zunächst werden die Proteine mittels SDS-

Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt, anschließend werden mittels Blotting die im Gel gebundenen Proteine elektrisch auf eine Trägermembran übertragen, die dann im letzten Schritt genutzt wird, um durch Immunoblot spezifische Proteinbanden nachzuweisen. Die Westernblots wurden in Anlehnung an das Protokoll von Towbin (Towbin et al., 1979) durchgeführt. Dem eigentlichen Westernblot gehen einige Schritte voraus, wie die Proteinextraktion aus dem Zell Lysat, eine Proteinbestimmung und das Gießen der Gele. Auf jeden dieser Schritte soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

#### 2.2.2.1.1. Proteinextraktion und Proteinaufarbeitung

Um Proteine mittels Westernblot nachzuweisen, müssen diese zunächst aus den entsprechenden Zellen extrahiert werden. Damit die nachfolgende Proteinbestimmung möglichst wenig verfälscht wird, ist es wichtig, die Zellen von Proteinen, die im Zellkulturmedium enthalten sind, zu bereinigen. Dies wurde dadurch erreicht, dass in einem ersten Schritt zunächst das verbrauchte Medium aspiriert und die anschließend Zellen mit eiskaltem DPBS gewaschen wurden, welches dann nach kurzer Inkubation ebenfalls aspiriert und verworfen wurde. Anschließend wurden dem Solubilisierungspuffer (Rezept siehe Kapitel 2.1.5) frisch der Phosphatase-Inhibitor-Cocktail 2 und 3, sowie ein Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugegeben. Erstere beiden verhindern die Dephosphorylierung von Proteinen und letzterer den Abbau der Proteine durch Proteinasen, was zusätzlich durch das konstante Arbeiten auf Eis verhindert wurde. Dies ist essenziell, da in dieser Arbeit Proteine und auch deren aktive, phosphorylierte Form durch Westernblot nachgewiesen wurden. Der Lysepuffer wurde anschließend direkt auf die Zellen pipettiert und diese für die vollständige Solubilisierung für 30 Minuten auf Eis mit diesem inkubiert. Das im Lysepuffer enthaltene Triton unterstützt die Permeabilisierung der Zellmembran und das Herauslösen von Membranproteinen. Anschließend wurden die Zellen mechanisch mittels Zellschaber vom Grund der 6-Lochplatte gekratzt und je nach Behandlungsgruppe in separate Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Anschließend wurden die Proteine von den nicht lysierbaren Zellbestandteilen durch Zentrifugation bei 15.000 xg und bei 4 °C getrennt. Der dadurch entstandene Überstand, der die Proteine enthielt, wurde anschließend in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Zellpellet mit den nicht lysierbaren

Zellbestandteilen wurde verworfen. Die Überstände wurden bis zur Verwendung bei -80 °C eingefroren.

### 2.2.2.1.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der unbekanntem Proteinkonzentration der verschiedenen Proben ist essenziell, da dadurch das Volumen der Proteinladung rechnerisch an die unterschiedlichen Proteinkonzentration der Proben angepasst werden kann. Dies bewirkt, dass netto gleich viel Protein pro Spur aufgetragen und ein Vergleich des Expressionslevels des Proteins von Interesse zwischen den verschiedenen Proben möglich wird. Die Proteinbestimmung nach Bradford basiert auf einer Änderung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie® Brillantblau G-250 von  $\lambda=470$  nm nach  $\lambda=595$  nm nach Proteinbindung in saurem Medium (Bradford, 1976). In der kationischen Form erscheint der Farbstoff rot ( $\lambda=470$  nm), in der neutralen Form grün ( $\lambda=650$  nm) und in der anionischen Form blau ( $\lambda=595$  nm). Deswegen wurde die Extinktion bei  $\lambda=595$  nm mittels Spektralphotometers gemessen. Mithilfe einer Kalibrierungskurve, die auf der Absorption von Proteinproben mit bekannter BSA-Konzentration beruht, konnten dann die unbekanntem Proteinkonzentrationen der Proben ermittelt werden. Alle der folgenden Arbeitsschritte wurden zur Verhinderung von Proteinabbau auf Eis durchgeführt. Zunächst wurde der BSA-Standard mit der Konzentration von 2 mg BSA/ml im Verhältnis 1:5 mit DPBS verdünnt. Pro Standard-Konzentration wurden 200  $\mu$ l als Gesamtvolumen festgelegt. Dieses setzte sich aus unterschiedlichen Volumina aus vorgelegtem DPBS und hinzu pipettierten verdünnten BSA-Standard zusammen. Es ergab sich folgendes Schema:

**Tab. 20:** BSA-Standardreihe

Standard-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
Proteingehalt [ $\mu$ g/ml]	0	5	10	20	40	80	120	160
PBS [ $\mu$ l]	200	197,5	195	190	180	160	140	120
Standard [ $\mu$ l]	0	2,5	5	10	20	40	60	80
total [ $\mu$ l]	200	200	200	200	200	200	200	200

Da die Beziehung zwischen Absorption und Proteingehalt nur in einem Proteinkonzentrationsbereich von 125–1,000  $\mu$ g/ml linear ist, wurden die Proben mit

unbekannten Proteinkonzentrationen entsprechend mit DPBS verdünnt (meistens im Verhältnis 1:150). Sowohl die verdünnten unbekannt Proben als auch der BSA-Proteinstandard wurden mithilfe eines Vortex-Geräts gründlich durchmischt. Um die statistische Signifikanz zu erhöhen, wurde jeder Standard dreifach und jede Probe mit unbekannter Proteinkonzentration zweifach pipettiert (jeweils 50 µl/Loch). Es wurde nach folgendem Schema vorgegangen:

**Tab. 21:** Pipettierschema BSA-Assay

	BSA-Standard			Proben mit unbekannter Proteinkonzentration								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BSA1	BSA1	BSA1	Probe A	Probe A	...	...	...	...	...	...	-
B	BSA2	BSA2	BSA2	Probe B	Probe B	...	...	...	...	...	...	-
C	BSA3	BSA3	BSA3	Probe C	Probe C	...	...	...	...	...	...	-
D	BSA4	BSA4	BSA4	Probe D	Probe D	...	...	...	...	...	...	-
E	BSA5	BSA5	BSA5	Probe E	Probe E	...	...	...	...	...	...	-
F	BSA6	BSA6	BSA6	Probe F	Probe F	...	...	...	...	...	...	-
G	BSA7	BSA7	BSA7	Probe G	Probe G	...	...	...	...	...	...	-
H	BSA8	BSA8	BSA8	...	...	...	...	...	...	...	...	-

Anschließend wurde das Bradford-Reagenz im Verhältnis 1:10 mit ddH<sub>2</sub>O in der Färbekammer verdünnt, vermischt und mittels Multipipette pro Loch 150 µl verdünnte Bradford-Reagenz zu den Ansätzen hinzugegeben. Zuletzt wurde die Absorption bei  $\lambda=595$  nm im Spektralphotometer gemessen und mithilfe von Victor Wallac, Software Version 3.0 ausgewertet. Unter Berücksichtigung der Kalibrierungskurve und der jeweiligen Verdünnung konnte die jeweilige Proteinkonzentration/Loch bestimmt werden. Die endgültige Proteinkonzentration ergab sich aus der Berechnung des Mittelwertes der Einzelmessungen. Nach der Proteinbestimmung wurde das Solubilisat mit fünffachem Probenpuffer versehen und bei -80 °C eingefroren. Das im Probenpuffer enthaltene durch die Sulfatgruppen negativ geladene SDS lagert sich dabei als Detergens den Proteinen an, denaturiert diese und sorgt für eine gleichmäßige negative Ladung aller Proteine. Es ermöglicht dadurch in der anschließenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese eine Auftrennung der Proteine ausschließlich proportional zu deren relativen Molekulargewicht und unabhängig von deren Aminosäuresequenz bzw. deren Eigenladung. Das ebenfalls

enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol wirkt reduzierend auf mögliche Disulfidbrücken und unterstützt die Denaturierung der Proteine.

#### 2.2.2.1.3. Herstellung des Trenn- und Sammelgels

Die Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden nach der Zusammensetzung in Kapitel 2.1.5 selber hergestellt. Das Polyacrylamidgel besteht dabei in seiner Ganzheit aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Zunächst wurden die Gelgießkammern aufgebaut, die Gläser zunächst mit EtOH und anschließend mit ddH<sub>2</sub>O abgespült. Dann wurden die Gläser mit einem Silikonband als Abstandshalter (Spacer) übereinandergelegt, angedrückt und mit Klammern befestigt. Nachdem die Polymerisation des Trenngels mittels des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und des Polymerisierungskatalysators Tetramethylethyldiamin (TEMED) in Gang gesetzt wurde, wurde dieses Gemisch rasch zwischen die abgedichteten Glasplatten gegossen. Des Weiteren wurde das Trenngel nach oben hin mit Isopropanol überschichtet, um einer Blasenbildung vorzubeugen, sowie eine korrekte Polymerisation ohne Sauerstoffkontakt zu gewährleisten. Nach dem vollständigen Auspolymerisieren wurde das Isopropanol abgekippt und mit ddH<sub>2</sub>O nachgespült. Anschließend wurde die Polymerisation des Sammelgels ebenfalls mit APS und TEMED in Gang gesetzt. Auch dieses Gemisch wurde dann zügig zwischen die abgedichteten Glasplatten und auf das Trenngel gegossen. Anschließend wurde vorsichtig und unter Vermeidung von Luftblasen ein Kunststoff-Taschenkamm eingesetzt, um Taschen für die späteren Proben zu schaffen. Die fertig gegossenen und vollständig polymerisierten Gele wurden bis zur Verwendung, maximal jedoch zwei Tage, bei 4 °C im Kühlschrank in feuchten Umschlägen gelagert.

#### 2.2.2.1.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli

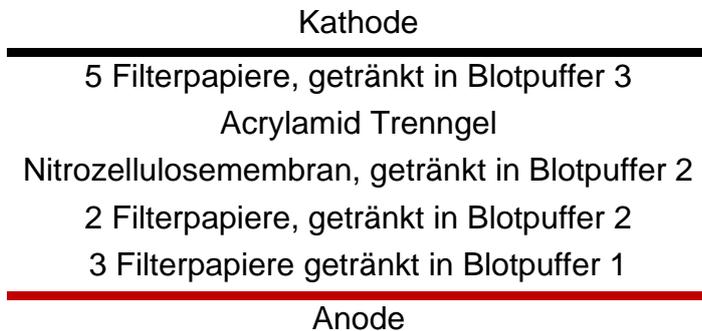
Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) wandern die aufgetragenen Proteine durch eine halb feste Trägermembran entlang eines künstlich geschaffenen elektrischen Feldes von der Kathode zur Anode. Vor der Gelelektrophorese wurden die Proben für 10 Minuten bei 95°C im Heizblock gekocht, um eine ausreichende Denaturierung sicherzustellen. Nach der Entfernung des Silikonbandes wurden die Gele mit der Öffnungsseite nach innen in die Laufkammer eingespannt und mit Klammern fixiert. Anschließend wurde 1x Laufpuffer an die Kante zwischen Sammelgel und Kunststoff-Taschenkamm pipettiert und der

Kunststoff-Taschenkamm vorsichtig unter leichtem Zug entfernt. In die nun frei gewordenen 13 Taschen wurden die mit SDS-Probenpuffer versehenen und aufgekochten Proben geladen. Dabei wurde anhand der im Bradford-Assay bestimmten Proteinkonzentrationen der unterschiedlichen Proben, orientierend an der geringst konzentriertesten Probe, gleich viel Protein pro Spur aufgetragen, maximal jedoch 50 µg. Durch dieses Verfahren wurde die Vergleichbarkeit zwischen den Proben im späteren Immunoblot gewährleistet. Das Auftragsschema wurde stets notiert, um die Spuren später zuordnen zu können. In mindestens eine eigene Tasche wurden 5 µl der BLUEplus prestained Protein Ladder geladen, die farbige Proteine mit bekannter Größe enthielt, um den später im Immunoblot nachgewiesenen Banden ein bestimmtes, größenspezifisches relatives Molekulargewicht zuordnen zu können. Anschließend wurde die Laufkammer oben und unten mit 1x Laufpuffer aufgefüllt, die Vorrichtung aufgesetzt und die Gelelektrophorese gestartet. Zunächst wurde für 10 Minuten eine konstante Stromstärke von 10 mA pro Gel und entsprechender Spannung, maximal jedoch 300 V angelegt, um die Proben im Sammelgel in einer Ebene zu fokussieren. Anschließend wurde bei gleichbleibender Spannung, die Stromstärke auf 25 mA pro Gel erhöht und die Gele für ca. 60 Minuten laufen gelassen. In dieser Phase fand die eigentliche Trennung nach Proteingröße im Trenngel statt.

#### 2.2.2.1.5. Halbtrockener Membran-Transfer

Nach der Gelelektrophorese findet das eigentliche „Blotting“ statt. Die in dem Gel enthaltenen Proteine wurden in diesem Schritt auf eine Nitrozellulose-Membran nach dem Semidry-Verfahren transferiert, um durch das Immobilisieren der Proteine auf einer Trägermembran den anschließenden Immunoblot zu ermöglichen. Dies geschah über einen Sandwich-Aufbau bestehend aus einer definierten Reihenfolge aus Filterpapieren getränkt in jeweils festgelegten Blotpuffern, dem Trenngel und der Nitrozellulose-Membran. Mittels eines senkrecht zum Aufbau angelegten elektrischen Felds wurden die Proteine so übertragen, dass die elektrophoretische Auftrennung erhalten bleibt. Zunächst musste dafür das Gel zwischen den Glasscheiben freigelegt werden. Dazu wurde die Scheibe mit der oberen Öffnung vorsichtig mit einem Spatel aufgehebelt. Nun wurde mithilfe eines Filterpapiers, welches an der Sammelgel-Trenngel Grenze

angedrückt und dann angehoben wurde, das Sammelgel abgenommen und verworfen. Anschließend wurde der Blot nach folgendem Schema aufgebaut:



**Abb. 1:** Schema des Blot-Sandwich

Durch das in den Blotpuffern enthaltene Methanol wird das Detergens Natriumlaurylsulfat ausgewaschen, sodass die Proteine dadurch einen Teil ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur wiedereinnehmen können. Schließlich wurde das für die Übertragung benötigte elektrische Feld angelegt: Für 60 Minuten wurde eine konstante Stromstärke von  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Membran mit entsprechender Spannung, maximal jedoch  $300 \text{ V}$  angelegt. Für 2 Gele, die jeweils eine Fläche von  $5 \text{ cm} \times 11 \text{ cm} = 55 \text{ cm}^2$  haben, bedeutete dies eine Stromstärke von  $88 \text{ mA}$ . Nach Abschluss des Transfers wurde der Blot abgebaut und die Nitrozellulosemembranen mit der Oberseite nach oben in eine Färbeschüssel mit Ponceau-Lösung gegeben. Die reversible Färbung hat mehrere Funktionen: Zum einen kann ein korrekter Transfer der Proteine vom Trenngel auf die Nitrozellulosemembran überprüft werden, zum anderen kann aber auch die Gleichladung der Spuren überprüft werden. Des Weiteren hat die Ponceau Färbung einen günstigen Effekt auf die Antikörperbindung im folgenden Immunoblot. Die überschüssige Ponceau-Lösung wurde dann mehrfach mit  $\text{ddH}_2\text{O}$  entfernt und die Membran anschließend mittels DPBS wieder entfärbt.

#### 2.2.2.1.6. Immunologischer Antigen Nachweis mittels Chemilumineszenz

Beim immunologischen Antigennachweis werden die in der Nitrozellulose gebundenen Proteine mit einem antikörpergekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Der Primärantikörper bindet dabei direkt das gesuchte Epitop des Proteins, der Sekundärantikörper das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) war für die per Imager nach Zugabe von Substrat detektierbare Lumineszenz Reaktion verantwortlich.

Für den immunologischen Antigennachweis mussten die Nitrozellulosemembranen demnach mehrfach mit unterschiedlichen Flüssigkeiten und Reagenzien inkubiert werden. Dafür wurden zunächst sogenannte Parafilm®-Schiffchen gebastelt, die passgenau an die Nitrozellulosemembran angepasst wurden, in denen dann das Blocken und die Antikörper-Inkubation auf einem Kippschüttler stattfand. Anschließend wurden die Membranen nach Herstellerprotokoll des Primärantikörpers entweder mit 5 % fettarmen Milchpulver in TBST oder mit 5 % BSA in TBST für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um für die anschließende Antikörperinkubation unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Dann wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit dem jeweiligen Primärantikörper in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration (vgl. Tab. 9, Kapitel 2.1.8) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Primärantikörper verworfen und die Membranen dreimalig für 5 Minuten mit TBST gewaschen, bevor die Membranen dann mit dem HRP-konjugierten Sekundärantikörper in einer 1:10.000 Verdünnung für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Inkubationslösung war wie auch beim Primärantikörper entweder 5 % fettarmes Milchpulver in TBST oder 5 % BSA in TBST. Anschließend wurde der Sekundärantikörper verworfen. Danach wurden die Membranen zweimalig für 5 Minuten mit TBST und ein letztes Mal 5 Minuten mit TBS gewaschen, um eine Kreuzreaktion zwischen Tween®20 und der Entwicklerlösung zu vermeiden. Für die Auswertung wurden die beiden Substratkomponenten A und B des SuperSignal® West Pico im Verhältnis 1:1 vermischt. Mit dieser Arbeitslösung wurden die Membranen dann für 5 Minuten inkubiert, bevor überschüssige Lösung abgenommen und verworfen wurde. Der Sekundärantikörper konnte dann nach Zugabe des gemischten Substrates, per Chemilumineszenz-Signal detektiert werden. Die Visualisierung erfolgte vom registrierenden Gerät Amersham™ Imager 600 nach automatischen sowie manuell eingestellten Zeitpunkten.

#### 2.2.2.2. Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Das Proteome Profiler™ Human XL Cytokine Array kit wurde zur Analyse der Zellkulturüberstände auf darin enthaltene Zytokine verwendet. Das Assay ermöglichte den semiquantitativen Nachweis von 105 löslichen humanen Proteinen. Das Prinzip des Assays basiert auf einer ELISA-Technik, dem sogenannten Sandwich ELISA. Auf der vorgefertigten Nitrozellulosemembran sind in Duplikaten an festgelegten Stellen

sogenannte Fangantikörper (engl. capture antibodies) gebunden. Nach Zugabe des konditionierten Mediums inkubierten die im Medium enthaltenen Antigene über Nacht mit den Fangantikörpern. Durch anschließende Waschschrte wurden unspezifische Antigene entfernt und die Membran mit einem Cocktail aus biotinylierten Detektionsantikörpern inkubiert. An dieser Stelle erklärt sich auch der Begriff des Sandwich ELISA, da das Antigen ab diesem Zeitpunkt von zwei Seiten von Primärantikörpern an unterschiedlichen Epitopen gebunden wurde. Nach weiteren Waschschrten wurde die Membran mit einem dritten Antikörper, Streptavidin-HRP, inkubiert. Dieser band an den Fc-Teil des biotinylierten Antikörpers. Danach folgten weitere Waschschrte. Die Visualisierung des Sekundärantikörpers via Lumineszenz erfolgte vom registrierenden Gerät Amersham™ Imager 600 nach automatischen sowie manuell eingestellten Zeitpunkten. Dabei war das an den Streptavidin gekoppelte Enzym HRP für die nach Zugabe von Substrat detektierbare Lumineszenz Reaktion verantwortlich. Es wurde stets nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen. Um die statistische Signifikanz zu erhöhen, wurde jedes Zytokin in Duplikaten gemessen. Die endgültige relative Proteinkonzentration ergab sich aus der Berechnung des Mittelwertes der Einzelmessungen abzüglich des Wertes der Negativkontrolle.

### 2.2.3. Sonstige Methodik

#### 2.2.3.1. Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assay mittels Kristallviolett-Färbung

Für alle vorklinischen Signalweginhibitoren und einige Reagenzien wurden Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays durchgeführt. Dabei wurde sich am Protokoll von Timothy Lane (University of California, Los Angeles) orientiert. Hierzu wurden  $2 \times 10^3$  Zellen/Loch im jeweils für die Zelllinie passendem Medium ausgesät. Einen Tag später wurde eine Verdünnungsreihe mit unterschiedlichen Konzentrationen der Inhibitoren angesetzt und jeweils 3 Löcher pro Konzentration pro Zelllinie mit diesem behandelt. Da alle Inhibitoren in DMSO gelöst waren, aber durch die unterschiedlichen Konzentrationen unterschiedlich viel Inhibitor/Loch hinzugegeben wurde, wurden sowohl die Kontrollen als auch die Löcher mit gering konzentriertem Inhibitor entsprechend zusätzlich mit DMSO behandelt. Letztendlich führte dieses Vorgehen dazu, dass der DMSO-Gehalt/Loch stets gleich war. Es wurde entsprechend vorgegangen, weil Studien zeigen konnten, dass DMSO auch

einen Einfluss auf humanzelluläre Prozesse haben kann (Verheijen et al., 2019). Nach den jeweiligen Inkubationszeiten wurden die Zellen mit DPBS gewaschen und mittels 0,05 % Kristallviolett-Färbelösung in 20 % Methanol für 30 Minuten gefärbt und fixiert. Eine Vorfixierung mit Formaldehyd war wegen der Methanol-Behandlung nicht mehr nötig. Überflüssiger Farbstoff wurde dann mittels ddH<sub>2</sub>O entfernt und die Mikrotiterplatten bei Raumtemperatur getrocknet. Zum Auswertungszeitpunkt wurde der in den Zellen verbliebene Farbstoff mit 50 µl 50 % EtOH eluiert und die Extinktion bei  $\lambda=595$  nm mittels Spektralphotometer gemessen. Da der Kristallviolett Farbstoff lebende Zellen anfärbt, sind die Extinktionswerte ein relatives Maß für die Anzahl der lebenden Zellen/Loch. Die endgültige relative Anzahl der lebenden Zellen ergab sich aus der Berechnung des Mittelwertes der Einzelmessungen abzüglich des Wertes der Negativkontrolle.

#### 2.2.3.2. Gewinnung und Lagerung des konditionierten Mediums

Das konditionierte Medium wurde nach 72h Inkubation bei 90 % Konfluenz der Zellen gewonnen und anschließend bei 15.000 xg für 10 Minuten abzentrifugiert. Der proteinreiche Überstand wurde anschließend durch einen 0,22 µM Sterilfilter filtriert, bis zur Benutzung kurzfristig bei 4 °C gelagert und langfristig bei -80 °C eingefroren. Um einen Nährstoffmangel der Zellen bei Behandlung mit konditioniertem Medium vorzubeugen, wurde das konditionierte Medium kurz vor Benutzung im Verhältnis 2:1 mit frischem Medium verdünnt.

#### 2.2.3.3. Laktatbestimmung im konditionierten Medium

Die Laktatbestimmung im konditionierten Medium fand in Zusammenarbeit mit dem Zentrallabor des Universitätsklinikums Bonn statt. Laktat wird durch das Enzym Laktatoxidase zu Pyruvat oxidiert. Das in der Reaktion gebildete Wasserstoffperoxid wird dann mittels Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt, der direkt proportional zur Laktatkonzentration ist und mittels UV/VIS-Spektroskopie gemessen werden kann.

#### 2.2.3.4. Gamma-Bestrahlung

Die Gamma-Bestrahlung der Zellen fand in Zusammenarbeit mit der Abteilung für Radiologie des Universitätsklinikums Bonn statt. Die Bestrahlung der Zellen wurde mit einer Dosisrate von 24 Gray/min und mit einer Energiedosis von 10, 5 und 2,5 Gray (Gy) durchgeführt. Es wurde darauf geachtet, dass die Flüssigkeitssäule unter 1 cm hoch war

und dass keine Silikonflaschen, sondern lediglich Plastik-Zellkulturflaschen genutzt wurden. Des Weiteren wurde kein sauerstoffhaltiges Medium verwendet, da durch dieses bei der Bestrahlung Sauerstoffradikale und Ozon entstanden worden wäre, die wiederum die Zellen zusätzlich geschädigt hätten.

#### 2.2.3.5. Auswertung und Statistik

Die semiquantitative statistische Auswertung der Westernblots erfolgte mit ImageJ (Version 1.53r, NIH, Bethesda, MD, USA) und Microsoft® Excel (Version 2019, Microsoft® Corporation, Redmond, USA). Beim Vergleich von zwei Gruppen wurde ein zweiseitiger t-Test durchgeführt, wobei statistisch signifikante Unterschiede für  $p < 0,05$  (\*) und statistisch hoch signifikante Unterschiede für  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) angenommen wurden und über dem jeweiligen Fehlerbalken dargestellt werden. Die numerischen Messdaten sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) aus n unabhängigen Experimenten.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Molekulargenetisches PD-L1 und CTLA-4 Screening diverser Tumorentitäten

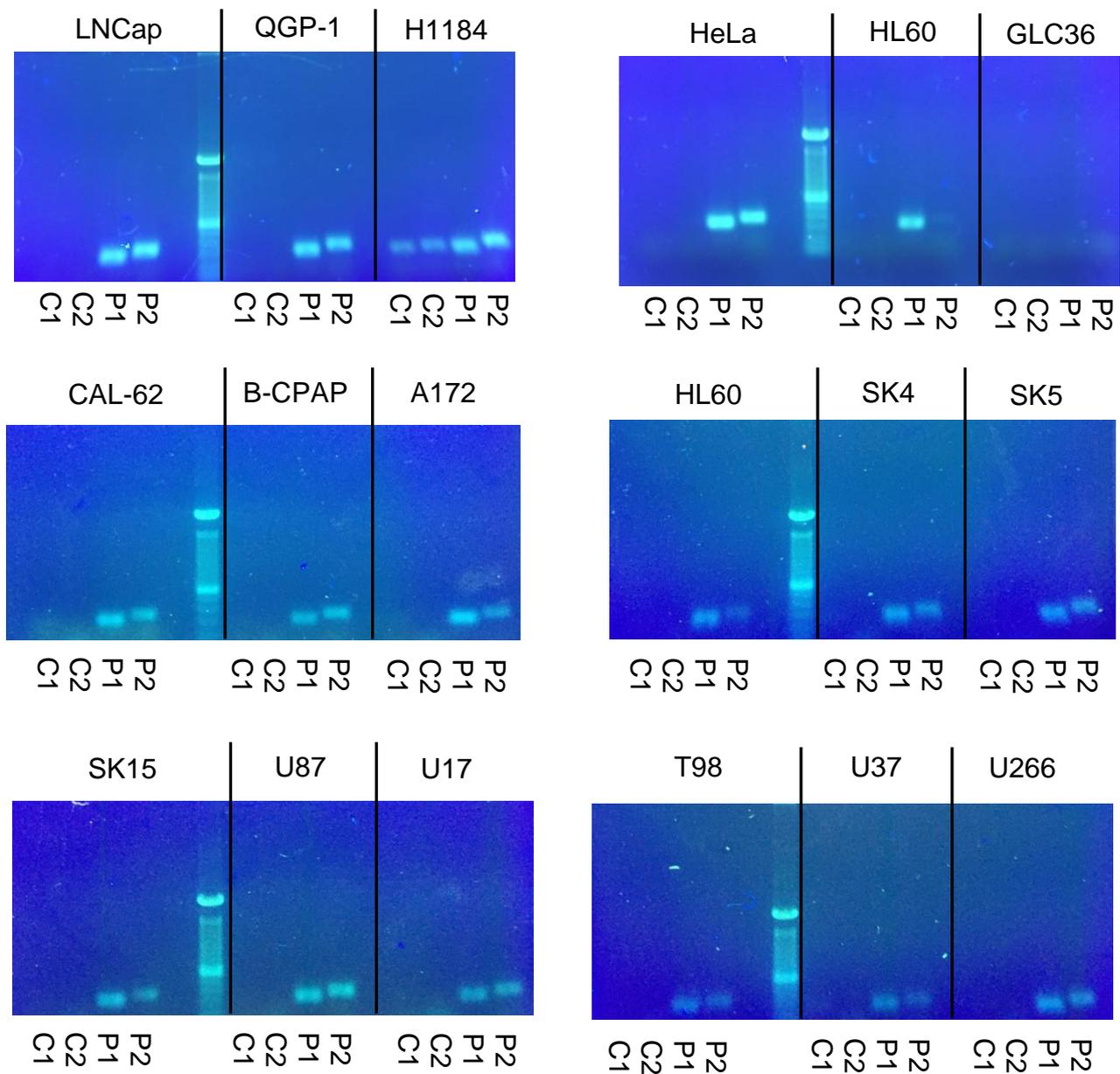
Diese Arbeit begann mit einer PCR-Screening-Untersuchung verschiedenster Tumorentitäten auf die Präsenz von CTLA-4 und PD-L1-RNA. Die meisten dieser Tumorentitäten zeigten eine Expression der PD-L1-RNA, nicht aber der CTLA-4-RNA. Die RNA ist eine Art Bauplan, der von den Ribosomen zur Synthese von Proteinen benötigt wird. Ist keine CTLA-4 oder PD-L1-RNA vorhanden, fehlt dieser Bauplan und es kann entsprechend kein CTLA-4- oder PD-L1-Protein von den Tumorzellen synthetisiert werden. Bei Vorhandensein der RNA kann jedoch keine Aussage zum Expressionslevel auf Proteinebene getroffen werden, da es viele weitere Faktoren gibt, die das Ausmaß der Translation einer RNA beeinflussen, wie beispielsweise miRNAs. Für die Messung des Expressionslevels müssten proteinbiochemische Methoden, wie beispielsweise die Methode des Westernblots, eingesetzt werden. Für die Zelllinien B-CPAP und CAL-62 wurde eine sehr starke basale PD-L1-Expression per Westernblot auf Proteinebene nachgewiesen.

**Tab. 22:** Ergebnisse der CTLA-4 und PD-L1-RNA-Screenings

Nr.	ICD-10	Zelllinie	Entität	CTLA-4		PD-L1	
				PP1	PP2	PP1	PP2
1	C18	HT29	Kolonkarzinom	-	-	-	-
2	C25	QGP	Somatostatinom	-	-	+	+
3	C34	A549	Lungenkarzinom, nicht kleinzellig	-	-	+	+
4	C34	GLC-36	Lungenkarzinom, kleinzellig	-	-	-	-
5	C34	(NCI-) H146	Lungenkarzinom, kleinzellig	-	-	+	+
6	C34	H1184	Lungenkarzinom, kleinzellig	+	+	+	+
7	C34	SCLC-24H	Lungenkarzinom, kleinzellig	-	-	+	+
8	C50	MCF-7	Mammakarzinom	-	-	+	+
9	C53	HeLa	Zervixkarzinom	-	-	+	+
10	C61	LNCaP	Prostatakarzinom	-	-	+	+
11	C61	PC3	Prostatakarzinom	-	-	+	+

12	C71	A1207	Glioblastom	-	-	+	+
13	C71	A172	Glioblastom	-	-	+	+
14	C71	SHSY5Y	Glioblastom, Astrozytom Grad III	-	-	+	+
15	C71	SKMG-15	Glioblastom	-	-	+	+
16	C71	SKMG-4	Glioblastom	-	-	+	+
17	C71	SKMG-5	Glioblastom	-	-	+	+
18	C71	T98	Glioblastom	-	-	+	+
19	C71	U178	Glioblastom	-	-	+	+
20	C71	U251	Glioblastom	-	-	+	+
21	C71	U373	Glioblastom	-	-	+	+
22	C71	U87-MG	Glioblastom	-	-	+	+
23	C71	TC620	Oligodendrogliom	-	-	+	+
24	C73	B-CPAP	Schilddrüsenkarzinom, papillär	-	-	+	+
25	C73	Cal62	Schilddrüsenkarzinom, anaplastisch	-	-	+	+
26	C73	FTC-133	Schilddrüsenkarzinom, follikulär	-	-	+	+
27	C74	SKN-MC	Neuroblastom	-	-	+	+
28	C76	BHY	Orales Plattenepithelkarzinom	-	-	+	+
29	C90	U266	Plasmozytom	-	-	+	+
30	C92	HL60	Promyeloische Leukämie	-	-	+	-
31	D11	A64-CLS	Adenom aus Glandula submandibularis	-	-	+	+

Per Kamerasystem dokumentierte PCR-Ergebnisse (in Auszügen):

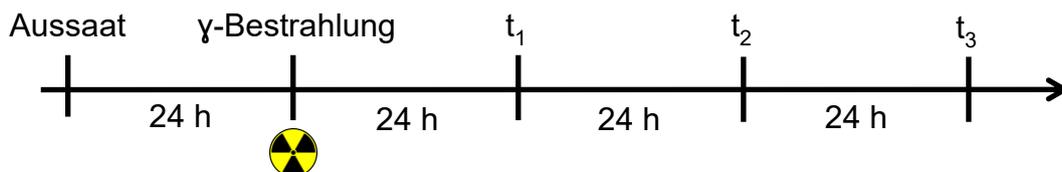


**Abb. 2:** Fotodokumentation der PCR PD-L1/CTLA-4 Screening-Ergebnisse  
Abgebildet sind die mittels UV-Transilluminator sichtbar gemachten Laufbanden. Die jeweilige Zelllinie ist per Abkürzung über den Grafiken dargestellt. Die jeweils genutzten Primerpaare sind unterhalb der Grafiken dargestellt: C1= CTLA-4 Primerpaar 1, C2= CTLA-4 Primerpaar 2, P1= PD-L1 Primerpaar 1, P2= PD-L1 Primerpaar 2.

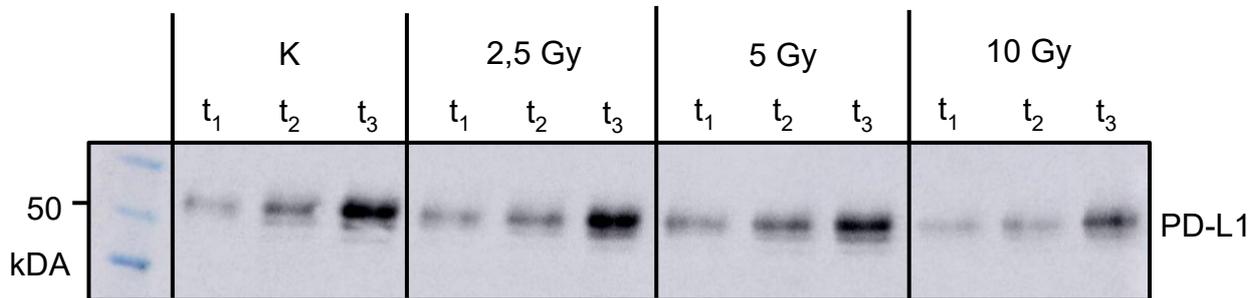
### 3.2. Gammabestrahlung hat keinen Einfluss auf die PD-L1-Expression

Vorausgegangene Studien hatten eine signifikante Elevation des PD-L1-Expressionslevels durch exogenen Stress, insbesondere durch Strahlung induzierter DNA-Doppelstrangbrüchen, gezeigt (Sato et al., 2017). Deswegen galt unser erstes Interesse diesem Einflussfaktor. Es stellte sich also die Frage, ob eine Behandlung der Schilddrüsenkarzinomzelllinien mit radioaktivem Jod-131 möglich wäre. Essenziell für eine solche Behandlung ist die Expression des Natrium-Iodid-Symporters (NIS), da Jod ausschließlich über diesen Transporter in die Zellen gelangt. Die Zelllinie CAL-62 weist von Natur aus aufgrund ihres undifferenzierten Ursprungs keine basale Expression des NIS-Transporters auf (Li und Ain, 2010). Differenzierte Schilddrüsenkarzinome werden aufgrund ihrer NIS-Expression heutzutage oft mit der Radiojodtherapie mit Jod-131 behandelt. Es war also zu erwarten, dass die Zelllinie B-CPAP, die differenzierten Ursprungs ist, eine NIS-Expression aufwies. Überraschend war es demnach, dass sie in unserem RNA-Screening für die NIS-Transporter-Gensequenz keine Expression aufwies. Eine Erklärung dafür könnte die BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation der Zelllinie sein, für die gezeigt wurde, dass sie durch Histon-Acetylierung des NIS-Promoters ebendiesen inaktivieren kann (Zhang et al., 2014). Da Gammastrahlung, genauso wie die durch das Jod-Isotop <sup>131</sup>I freigesetzte Betastrahlung, DNA-Doppelstrangbrüche erzeugt, wurde deshalb stellvertretend Gammastrahlung zum Testen dieses Einflussfaktors verwendet.

Es wurden pro Zelllinie insgesamt n=8 Versuche durchgeführt. Die Zellen wurden jeweils mit drei Dosisstärken behandelt und das PD-L1-Expressionslevel zu drei Zeitpunkten per Westernblot erfasst. In keinem dieser Versuche zeigte sich eine bestrahlungsabhängige Induktion des PD-L1. Jedoch zeigte sich bei der Zelllinie B-CPAP ein interessantes Phänomen: In allen Behandlungsgruppen und in der Kontrolle zeigte sich eine zeitabhängige PD-L1-Induktion.



**Abb. 3:** Zeitachse zum Ablauf der Gammabestrahlung  
Die Zelllyse fand zu den Zeitpunkten  $t_1=24$  h,  $t_2=48$  h und  $t_3=72$  h nach Bestrahlung statt. Immer wenn sich im nachfolgenden auf  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  bezogen wird sind diese Zeitpunkte gemeint.



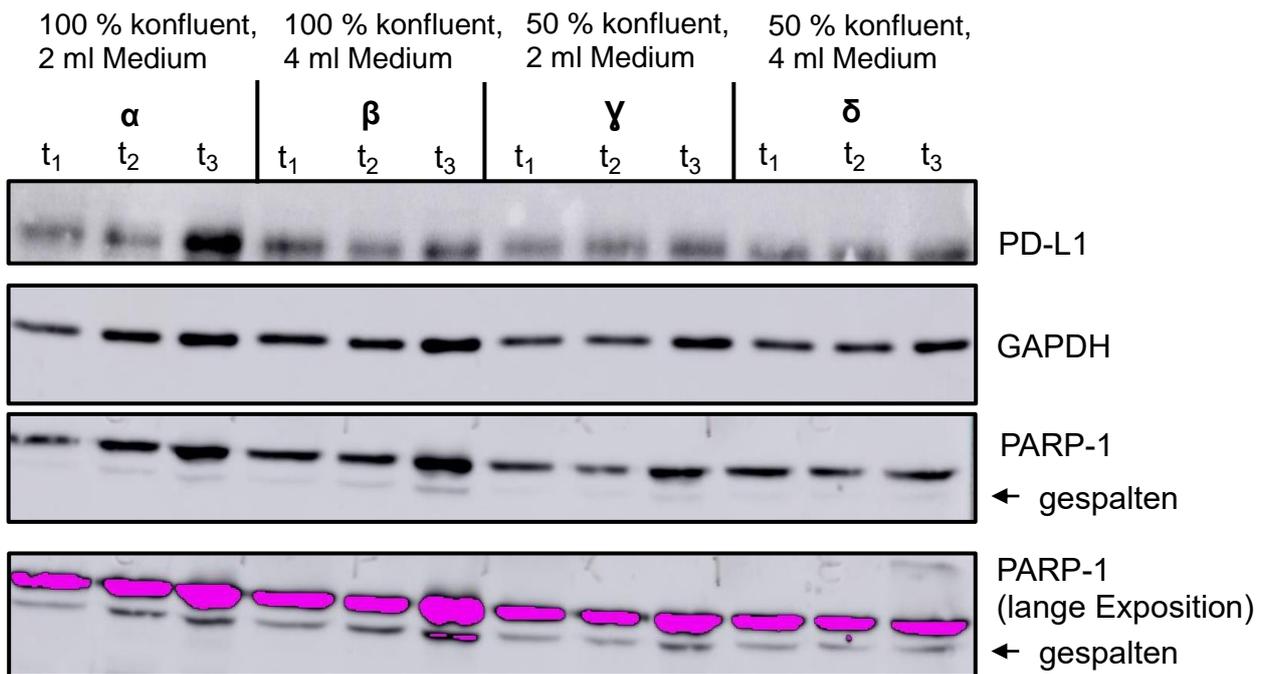
**Abb. 4:** Bestrahlungsunabhängige PD-L1-Induktion von B-CPAP im Zeitverlauf  
Abgebildet ist ein repräsentativer Westernblot von acht unabhängigen Experimenten.  
Pro Spur wurde gleich viel Protein (32 µg) aufgetragen. Eine Gleichladung wurde  
außerdem mittels Ponceau S Färbung kontrolliert.

### 3.3. Im Medium enthaltene Stoffe, nicht aber zunehmende Zelldichte oder Apoptose, induzieren PD-L1

Die bestrahlungsunabhängige PD-L1-Induktion im Zeitverlauf der Zelllinie B-CPAP sollte in diesem Versuch genauer untersucht werden. Es stellte sich die Frage, ob die Zellen durch eine im Zeitverlauf erhöhte Zelldichte, durch verstärkte Apoptose, oder durch sezernierte Botenstoffe das Expressionslevel von PD-L1 erhöhen. Für dieses Experiment wurden die vier Gruppen  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $\delta$  festgelegt. Die Gruppen  $\alpha$  und  $\beta$  wurden wie bisher ausgesät, d.h. zum Zeitpunkt  $t_0$  wird eine definierte Zellzahl ausgesät, wodurch die Zellen im Zeitverlauf konfluent werden und die Dichte zunimmt. Der Unterschied der beiden Gruppen liegt in der Menge des Mediums, mit welchem sie kultiviert wurden. Die Zellen der Gruppe  $\alpha$  wurden mit 2 ml Medium/Loch kultiviert, wohingegen die Zellen der Gruppe  $\beta$  mit 4 ml Medium/Loch kultiviert wurden. Die Gruppen  $\gamma$  und  $\delta$  wurden jeweils so ausgesät, dass sich zu jedem Lysezeitpunkt  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  jeweils ca. 600.000 Zellen/Loch befanden. Für das Vermehrungsverhalten der Zellen wurde eine Exponentialfunktion zugrunde gelegt. Nach mathematischer Umformung ergab sich für die Fragestellung, wie viele Zellen zum Zeitpunkt  $t_0$  ausgesät werden müssen um zu den Zeitpunkten  $t_1$ ,  $t_2$  und  $t_3$  jeweils 600.000 Zellen/Loch (ca. 50 %ige Konfluenz) zu haben folgende Formel:

$$c = 600.000 / 2^{\frac{u}{t}}$$

u= Zeitpunkt, an dem 600.000 Zellen vorhanden sein sollen, t= Verdopplungszeit, c= gesuchte Startpopulation zum Zeitpunkt  $t_0$ ). Die Verdopplungszeit war gegeben und wurde in der Literatur für die Zelllinie B-CPAP mit 30 Stunden angegeben. Für die Zelllinie CAL-62 betrug sie 24 Stunden. Diese Zeiten bestätigten sich auch in den Experimenten. Der Unterschied zwischen  $\gamma$  und  $\delta$  war der Gleiche wie zwischen  $\alpha$  und  $\beta$ , nämlich, dass  $\gamma$  mit 2 ml Medium/Loch und  $\delta$  mit 4 ml Medium/Loch kultiviert wurde.



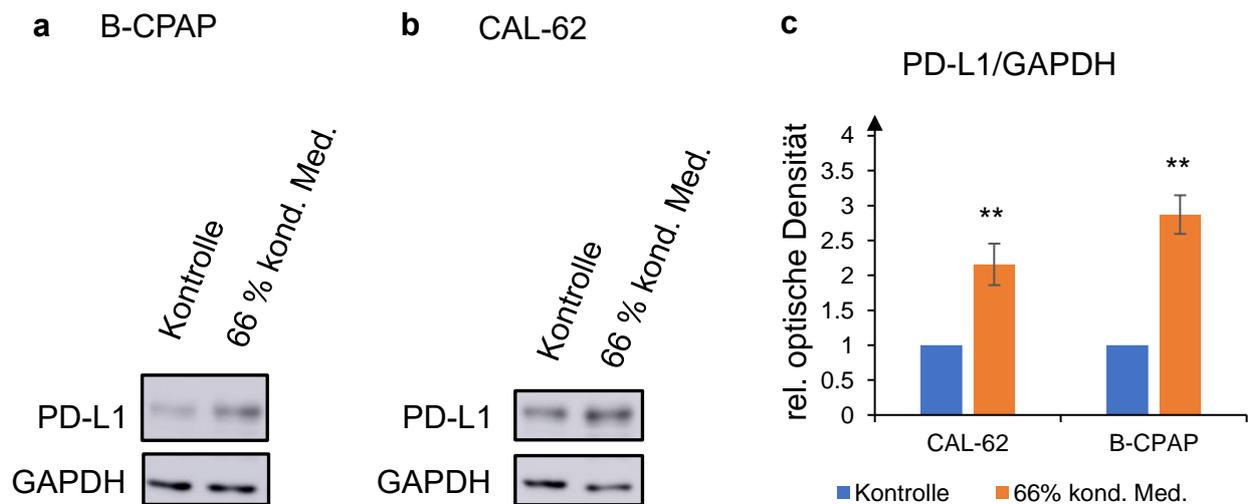
**Abb. 5:** Einfluss von Apoptose, Zelldichte und sezernierten Botenstoffen auf die PD-L1-Expression von B-CPAP  
Abgebildet ist ein repräsentativer Westernblot aus zwei unabhängigen Experimenten. Zeitpunkt t<sub>1</sub>=24 h, t<sub>2</sub>=48 h und t<sub>3</sub>=72 h nach Aussaat.

Auf den ersten Blick erkennbar ist die bereits aus den Bestrahlungsversuchen bekannte PD-L1-Hochregulation im Zeitverlauf der Versuchsgruppe  $\alpha$ . Interessanterweise fehlt diese Hochregulation in Gruppe  $\beta$ . Man könnte nun in Anbetracht des Unterschieds der PD-L1-Expression zum Zeitpunkt t<sub>3</sub> zwischen der Gruppe  $\alpha$  und  $\beta$  vermuten, dass der Nährstoffmangel (Kultivierung mit 2 ml Medium vs. 4 ml Medium) zum Zeitpunkt t<sub>3</sub> zur Hochregulation führt. Dies ist aber eher unwahrscheinlich, da ein manifester Nährstoffmangel auch zu einer verstärkten Apoptose führen würde. Dies ist nicht zu erkennen, da auch nach langer Exposition keine signifikant stärkere PARP-Spaltung der Gruppe  $\alpha$  zu erkennen ist. Eine vermehrte Proteolyse von PARP wäre bei vermehrter Apoptose aber zu erwarten, da dies einen Zwischenschritt des Apoptose-Vorgangs

darstellt. Der Vergleich von Gruppe  $\alpha$  mit Gruppe  $\gamma$  verleitet zur Schlussfolgerung, dass die Zelldichte der entscheidende Faktor für die Hochregulation ist. Dies würde allerdings zu einem Widerspruch führen: Wäre allein die Zelldichte entscheidend, wäre der Unterschied zwischen Gruppe  $\alpha$  und  $\beta$  zum Zeitpunkt  $t_3$  nicht zu erklären, da dort die Zelldichte identisch, das PD-L1-Expressionslevel aber unterschiedlich ist. Eine widerspruchsfreie Hypothese, die aus diesem Telexperiment abgeleitet worden ist, ist die, dass ein oder mehrere von den Zellen produzierte Botenstoffe, oder Stoffwechselprodukte alleine oder in Kombination ab einem bestimmten Schwellenwert zu einer Induktion von PD-L1 führt oder führen. Im folgendem wird der Einfachheit halber ausschließlich von einem Botenstoff gesprochen. Der Botenstoff wurde in Gruppe  $\beta$  durch das größere Volumen des Mediums verdünnt und erreichte nicht den nötigen Schwellenwert, um das PD-L1-Level zu induzieren. In den Gruppen  $\gamma$  und  $\delta$  befanden sich zu allen Zeitpunkten deutlich weniger Zellen/Loch, sodass auch weniger Botenstoff produziert wird und ebenfalls der Schwellenwert nicht erreicht wird. Da in allen Gruppen trotzdem ein gewisses Level an PD-L1 vorhanden ist, spricht dies für eine basale PD-L1-Expression die unabhängig von dem o.g. Mechanismus ist.

### 3.4. Behandlung mit konditioniertem Medium führt zur PD-L1-Induktion

Im nächsten Schritt sollte nun die Hypothese aus 3.3 weiter gestärkt werden. Dazu wurde eine weitere These aufgestellt: Sollten die Zellen einen oder mehrere Botenstoffe in das Medium sezernieren, so sollte man mit konditioniertem Medium bei frisch kultivierten Zellen PD-L1 induzieren können. Das Prinzip en détail war wie folgt: Eine bestimmte Anzahl an Zellen wurden für eine bestimmte Anzahl an Tagen in ihrem jeweiligen Medium kultiviert. Das Medium, welches entsprechend potenzielle Botenstoffe enthalten würde, wurde abgenommen. Dieses sogenannte konditionierte Medium wurde dann unmittelbar vor Gebrauch im Verhältnis 2:1 mit frischem Medium verdünnt, um einem Nährstoffmangel der frisch kultivierten Zellen vorzubeugen. Die frisch kultivierten Zellen wurden dann mit diesem verdünnten Gemisch behandelt. Das PD-L1-Expressionslevel dieser Zellen wurde dann zum Zeitpunkt  $t_3$  mit dem von Zellen, die in demselben Zeitraum ausschließlich mit frischem Medium kultiviert wurden verglichen. Es zeigte sich eine signifikante Elevation nach Behandlung mit konditioniertem Medium bei beiden Zelllinien.



**Abb. 6:** Konditioniertes Medium induziert PD-L1

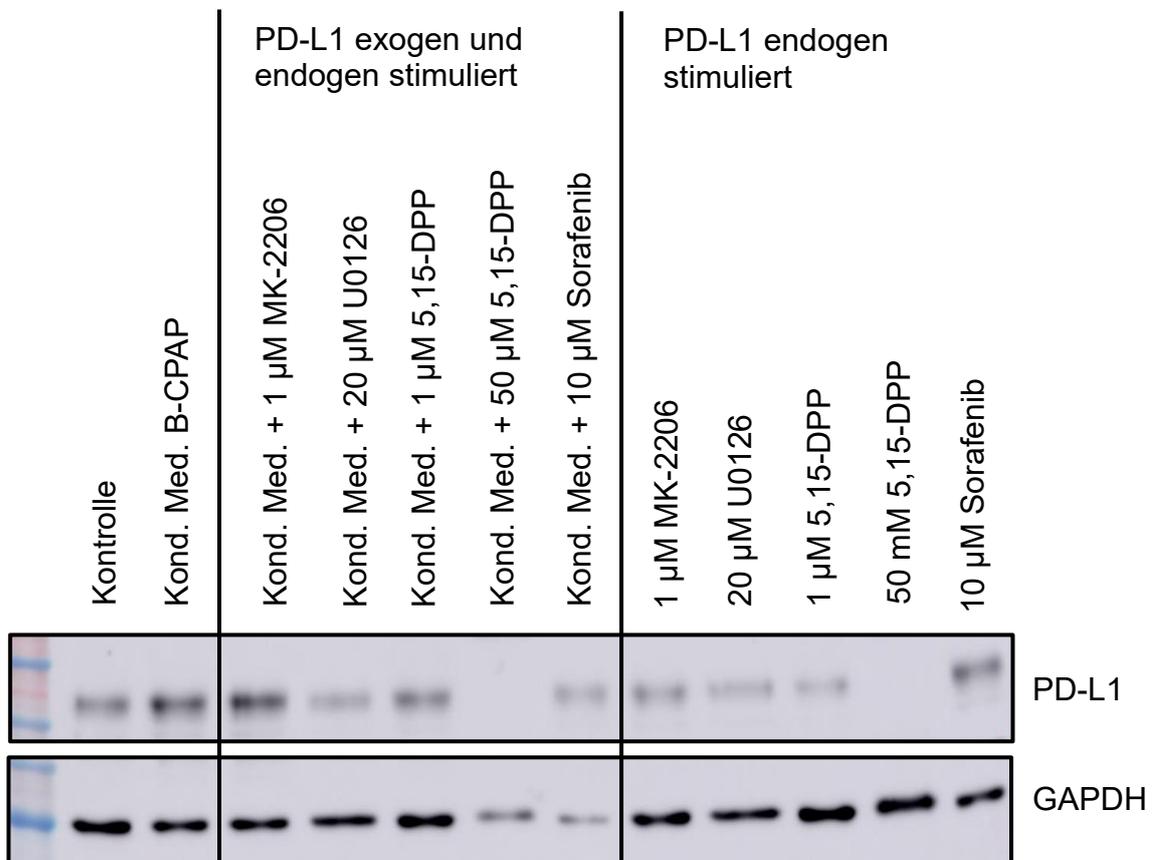
Die gewonnen Protein Lysate wurden mittels Western-Blot analysiert: a B-CPAP und b CAL-62. Abgebildet ist ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten. Densitometrische Analyse von c B-CPAP und CAL-62: Dargestellt ist der auf die Kontrolle normalisierte Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Das PD-L1-Level wurde anhand von GAPDH normalisiert. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

### 3.5. Einfluss von Signalweghemmstoffen auf die durch die Behandlung von konditioniertem Medium induzierte PD-L1-Expression

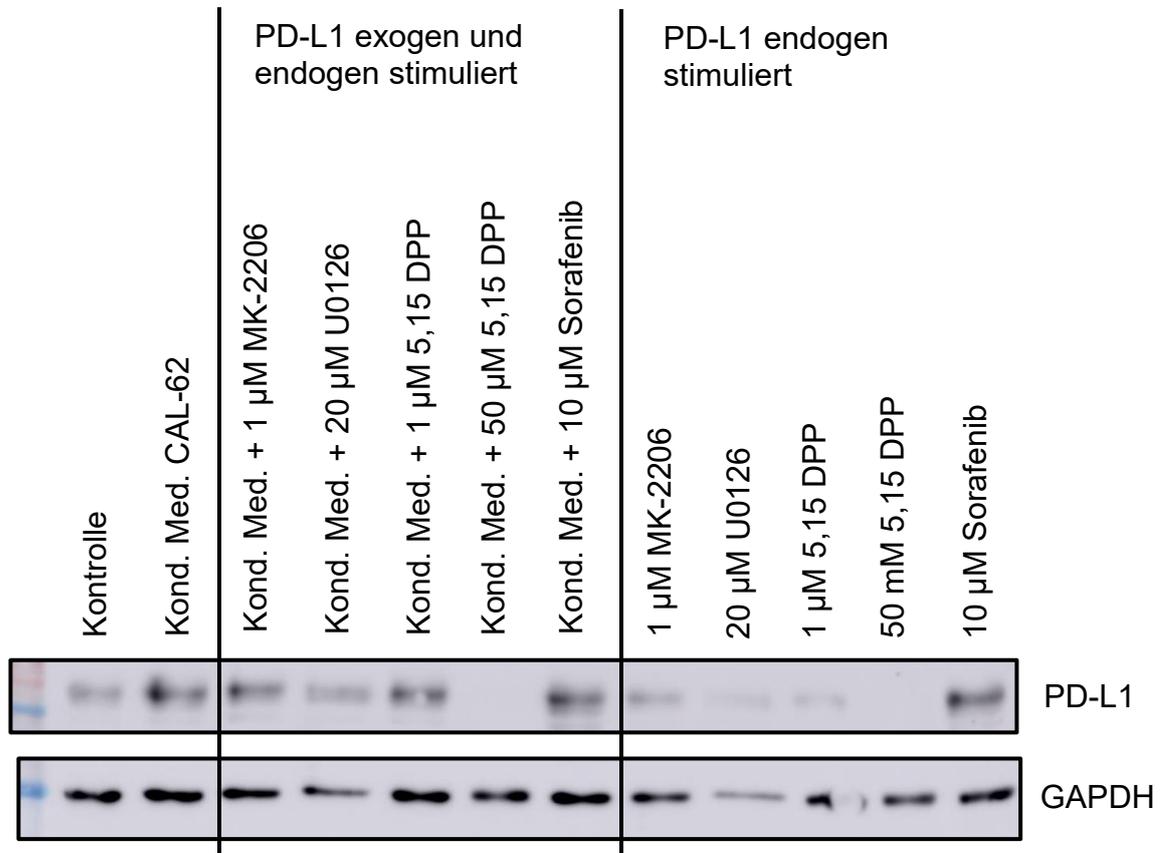
Im nächsten Schritt ging es darum, die durch das konditionierte Medium induzierte PD-L1-Expression genauer zu untersuchen: Welche onkogenen Signalwege sind an dieser Induktion beteiligt? Ein Problem bei dieser Fragestellung ist, dass die Zellen, die mit konditioniertem Medium behandelt werden, sich während der Inkubation mit selbigen vermutlich weiter selbst, also endogen, stimulieren. Die Behandlung mit den Signalweginhibitoren würde somit in der Theorie sowohl einen Einfluss auf die exogene Induktion, durch das konditionierte Medium, als auch auf die endogene Konditionierung der Zellen selbst haben. Letztendlich könnte man also durch die Änderung des Expressionslevels nicht sicher sagen, ob und zu welchem Anteil dies nun auf den Einfluss des Inhibitors auf die endogene oder exogene Stimulation zurückzuführen ist. Um dieses Problem näherungsweise betrachten zu können, wurde zusätzlich eine Kontrollgruppe

angesetzt, die nur mit entsprechend DMSO und Signalweginhibitor kultiviert wurde, also ausschließlich dem Einflussfaktor der endogenen Stimulation unterlag. Eine Kontrolle wurde zusätzlich ohne alles, sondern ausschließlich mit normalem Medium und entsprechend DMSO behandelt. Der DMSO-Gehalt/Loch war überall gleich. Zum Zeitpunkt  $t_3$  wurden alle Zellen lysiert und das PD-L1-Expressionslevel der verschiedenen Gruppen verglichen.

**a B-CPAP**



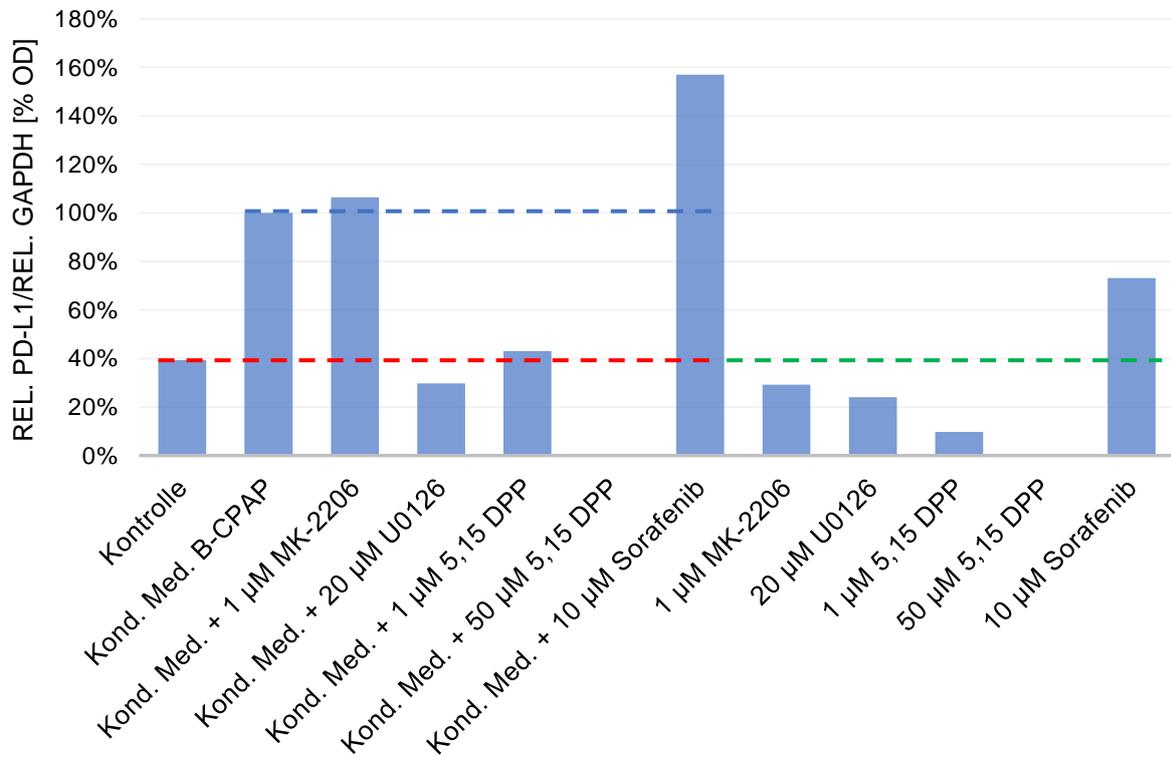
## b CAL-62



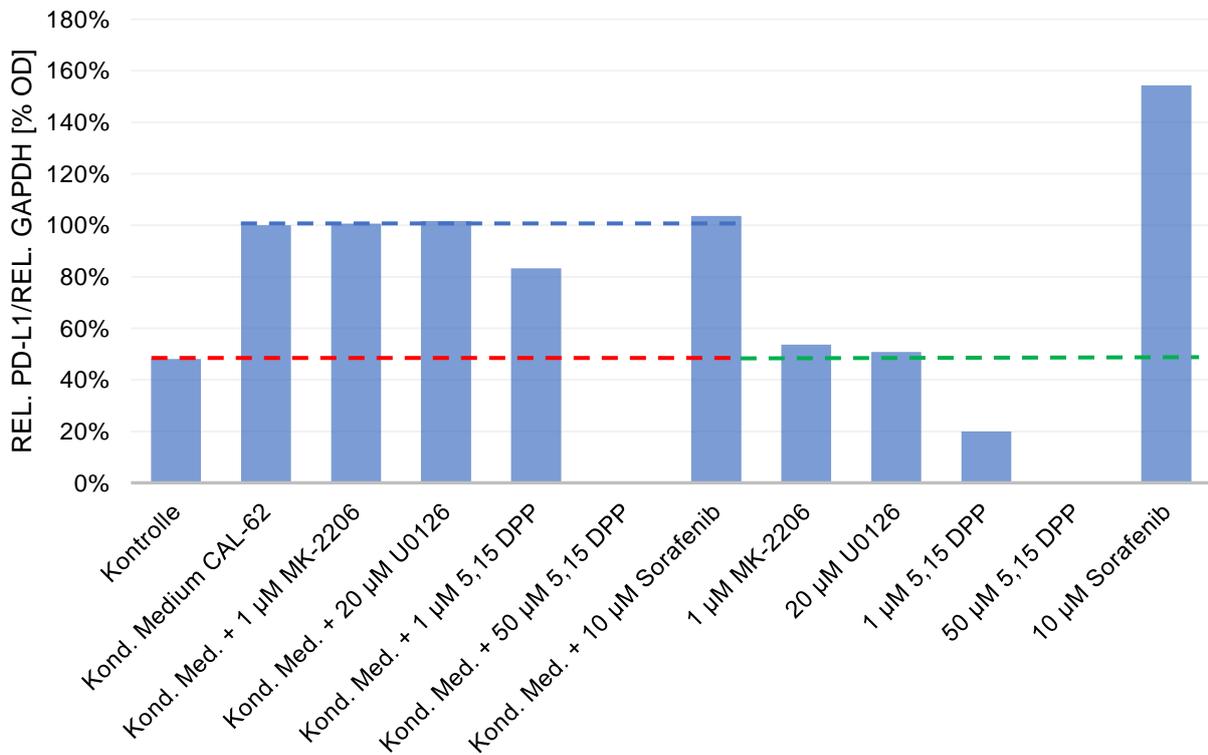
**Abb. 7:** Einfluss von Signalweginhibitoren auf die endogene und exogene PD-L1-Stimulation

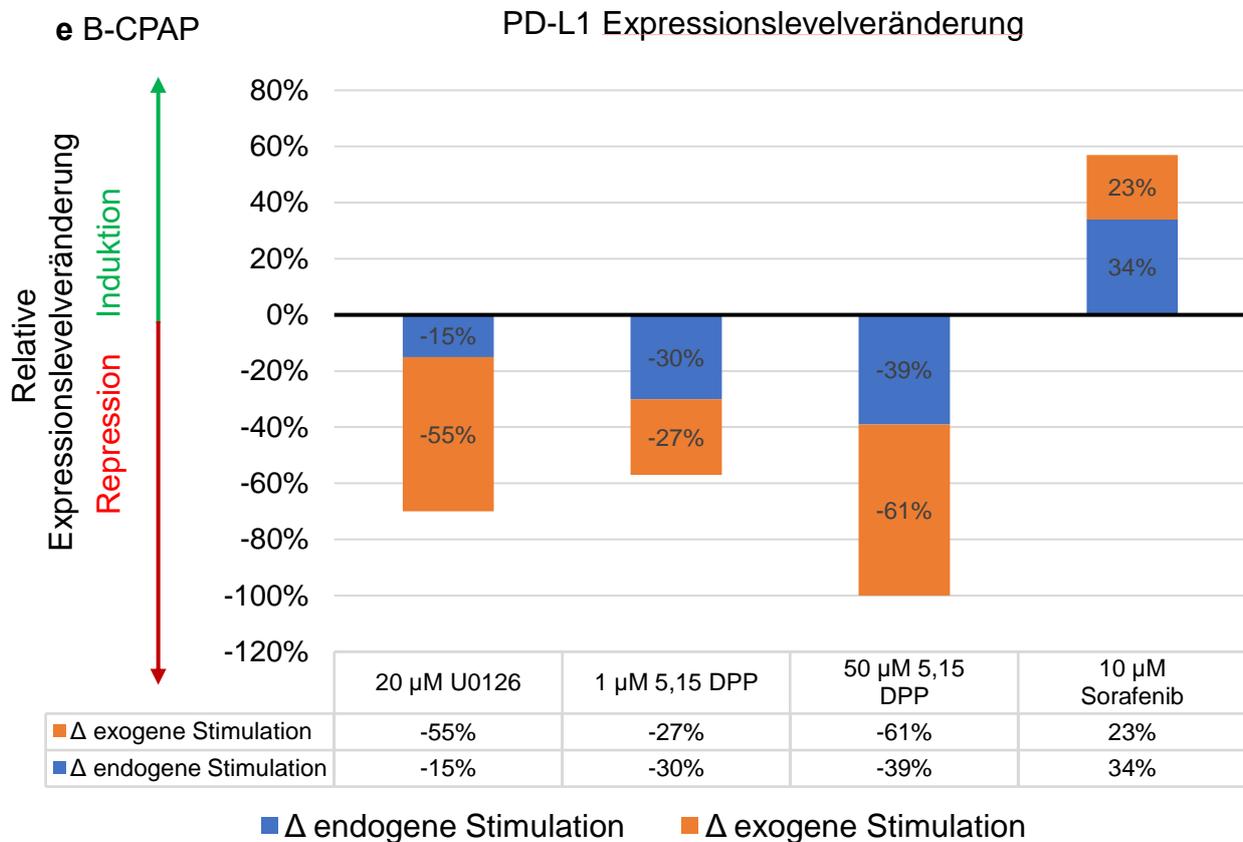
Die Zellen wurden entweder mit normalem Medium, mit konditioniertem Medium, mit Signalweginhibitoren, oder einer Kombination behandelt. Die nach 72h ( $t_3$ ) lysierten Proben wurden mittels Western Blot analysiert: a B-CPAP und b CAL-62. Abgebildet ist ein repräsentativer Westernblot von zwei unabhängigen Experimenten.

**c B-CPAP** Einfluss diverser Signalweginhibitoren auf die stimulierte PD-L1-Expression



**d CAL-62** Einfluss diverser Signalweginhibitoren auf die stimulierte PD-L1-Expression





**Abb. 8:** Densitometrische Auswertung der Westernblots zur Signalweginhibitor-Behandlung

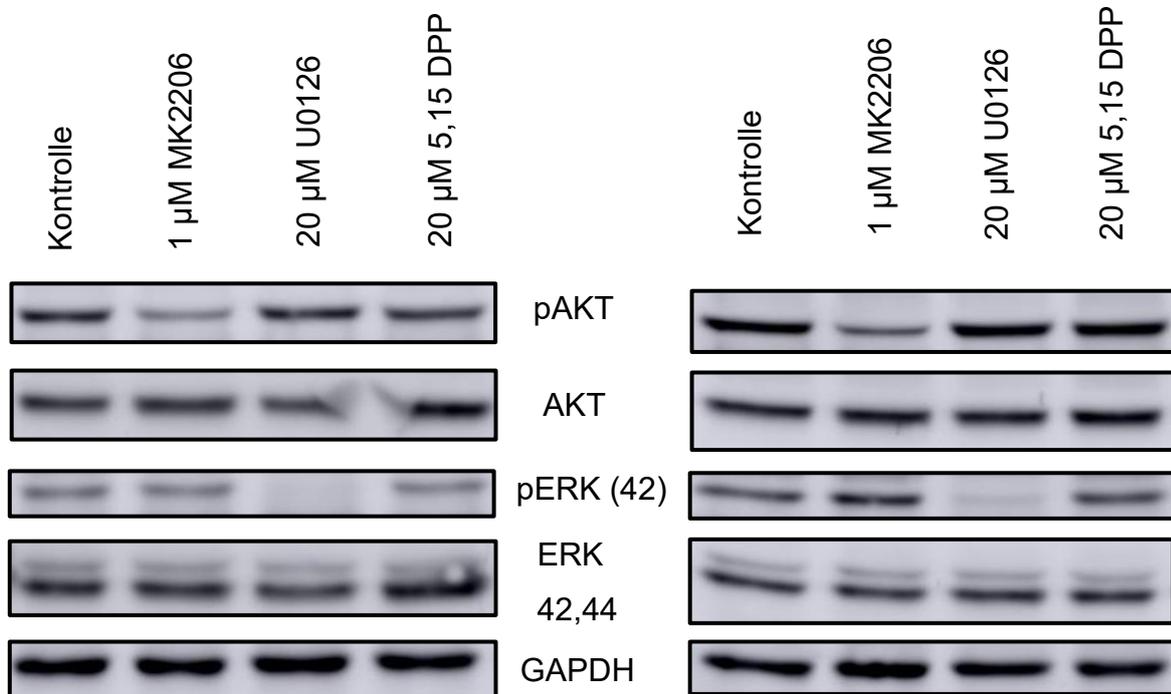
Die oben angegebene Westernblots wurden beispielhaft densitometrisch mittels ImageJ ausgewertet: c B-CPAP und d CAL-62: Die PD-L1-Expression wurde anhand von GAPDH normalisiert. e Beispielhafte rechnerische Korrektur des Fehlers der durch die Hemmung sowohl der endogenen, als auch der exogenen PD-L1-Stimulation entsteht.

In beiden Zelllinien erwies sich der JAK-STAT Inhibitor 5,15-DPP in beiden Konzentrationen, vor allem aber in der höheren Konzentration von 50  $\mu$ M als äußerst potenter Repressor: Es war nahezu kein PD-L1 mehr nachweisbar. Dies spricht für eine große Bedeutung dieses Signalwegs für das sowohl exogen als auch das endogen stimulierte PD-L1. Der Inhibitor 5,15-DPP hemmt sowohl die Dimerisierung von STAT-3 mit einer  $IC_{50}$  von 280 nM, als auch in höheren Konzentrationen mit einer  $IC_{50}$  von 10  $\mu$ M die Dimerisierung von STAT-1. Der PI3K-AKT Signalweg schien in Bezug auf die exogene und endogene PD-L1-Stimulation bei beiden Zelllinien eine untergeordnete Rolle gespielt zu haben. Mit dem PI3K-Inhibitor MK-2206 konnte dementsprechend bei beiden Zelllinien weder die exogene noch die endogene PD-L1-Stimulation signifikant beeinflusst werden.

Der MEK Inhibitor U0126 hatte ausschließlich bei den B-CPAP einen repressiven Effekt auf die PD-L1-Stimulation, vor allem aber auf die exogene PD-L1-Stimulation. Der Multikinaseinhibitor Sorafenib hatte in erster Linie bei den B-CPAP einen stark PD-L1 stimulierenden Effekt, sowohl bei der exogenen, als auch bei der endogenen PD-L1-Stimulation. Bei den CAL-62 beschränkte sich dies auf die endogene PD-L1-Stimulation.

### 3.6. Funktionskontrolle der Signalweginhibitoren

Im nächsten Schritt sollte nun die Funktion der JAK-STAT-, PI3K-AKT- und ERK-Inhibitoren überprüft und deren Beeinflussung gegenseitig überprüft werden. Dazu wurden die Zellen für 5 Stunden mit dem jeweiligen Signalweginhibitor inkubiert, dann lysiert und das Expressionslevel der phosphorylierten aktivierten Proteine miteinander verglichen.

**a B-CPAP****b CAL-62**

**Abb. 9:** Die Signalweginhibitoren inhibieren jeweils ihren Signalweg und beeinflussen sich nicht wechselseitig

Die gewonnen Protein Lysate wurden mittels Westernblot analysiert: a B-CPAP und b CAL-62. Abgebildet ist ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten.

Die erfolgreiche Inhibierung des PI3K-AKT und MEK-ERK Signalwegs ist an den deutlich reduzierten Banden des phosphorylierten AKT (pAkt) und phosphorylierten ERK (pERK) zu erkennen. Interessanterweise weisen die Zellen ausschließlich eine Phosphorylierung des 42 kDa schweren ERKs auf. Der Erfolg des Inhibitors 5,15-DPP kann nicht anhand des Westernblots verifiziert werden, da dieser nicht die Phosphorylierung, sondern die Dimerisierung hemmt, die der Phosphorylierung nachgeschaltet ist. Keiner der Inhibitoren hat einen signifikanten Einfluss auf einen der anderen Signalwege.

### 3.7. Untersuchung des konditionierten Mediums

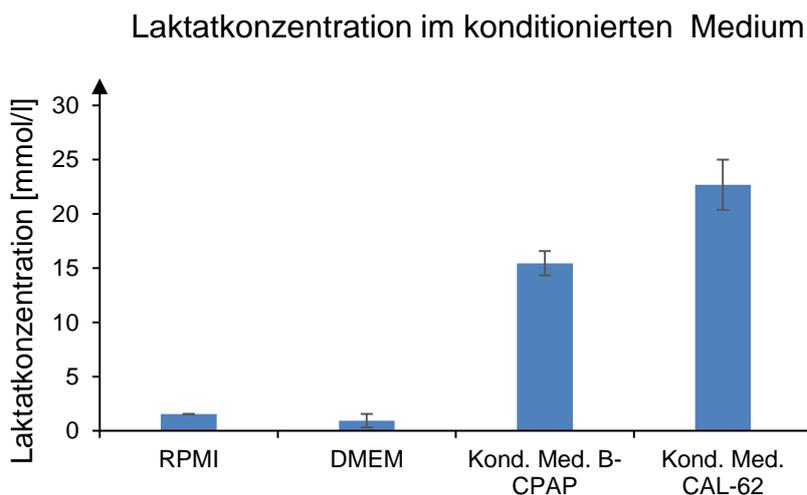
Die bisherigen Experimente sind noch unspezifisch, da das konditionierte Medium aller Voraussicht nach aus einem Cocktail unterschiedlicher Substanzen, Botenstoffen und

Abfallprodukten besteht, die auch wechselseitig miteinander in Interaktion stehen. Um sich diesem komplexen Problem zu nähern, wurde das konditionierte Medium genauer auf dessen Inhaltsstoffe untersucht. Nach Abschluss dieser Untersuchung könnten dann mittels Literaturrecherche einige Substanzen ausgewählt werden, deren Einfluss auf das PD-L1 schon für andere Zelllinien belegt wurde. So könnte man dann spezifisch für diese Substanzen einen Einfluss nachweisen, oder widerlegen.

### 3.7.1. Auf die Laktatkonzentration

Es ist schon lange Zeit bekannt, dass die anaerobe Tumormikroumgebung einen ungünstigen Effekt auf die Tumorprogression hat. Dem Laktat kommt dabei eine Schlüsselrolle zu, da es als Abfallprodukt der anaeroben Glykolyse zum sauren PH-Wert entscheidend beiträgt. Dieser Effekt basiert unter anderem auf einer endogenen Laktatproduktion durch die Tumorzellen selbst. In Zusammenarbeit mit dem Zentrallabor des Universitätsklinikums Bonn wurde der Laktatgehalt des konditionierten Mediums quantitativ per UV/VIS-Spektroskopie bestimmt.

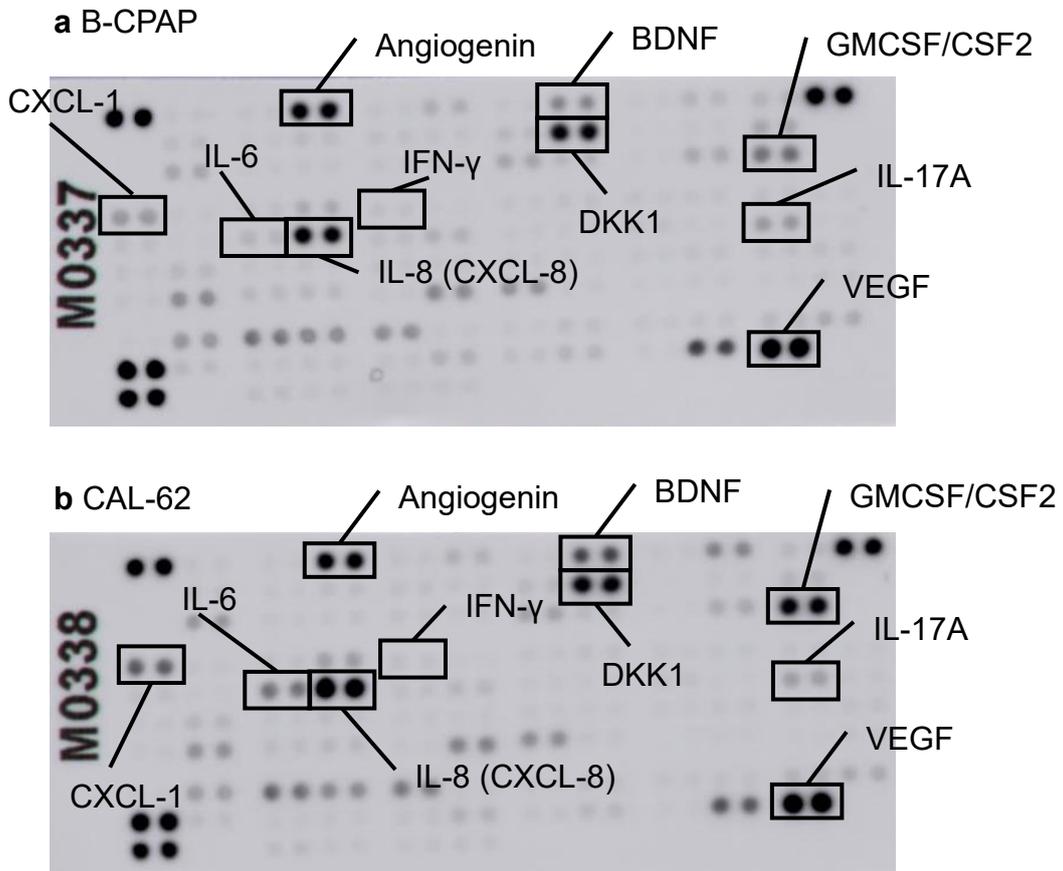
Es zeigte sich für beide Zelllinien eine sehr hohe Laktatkonzentration im konditionierten Medium. Die durchschnittliche Laktatkonzentration des konditionierten Mediums der Zelllinien lag abzüglich des Durchschnitts der Negativkontrolle bei 21,755 mmol/l für CAL-62 und bei 13,915 mmol/l für B-CPAP.



**Abb. 10:** Sowohl das konditionierte Medium von B-CPAP, als auch das der Zelllinie CAL-62 weist eine hohe Laktatkonzentration auf. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

### 3.7.2. Auf die Konzentration von anderen Signalbotenstoffen

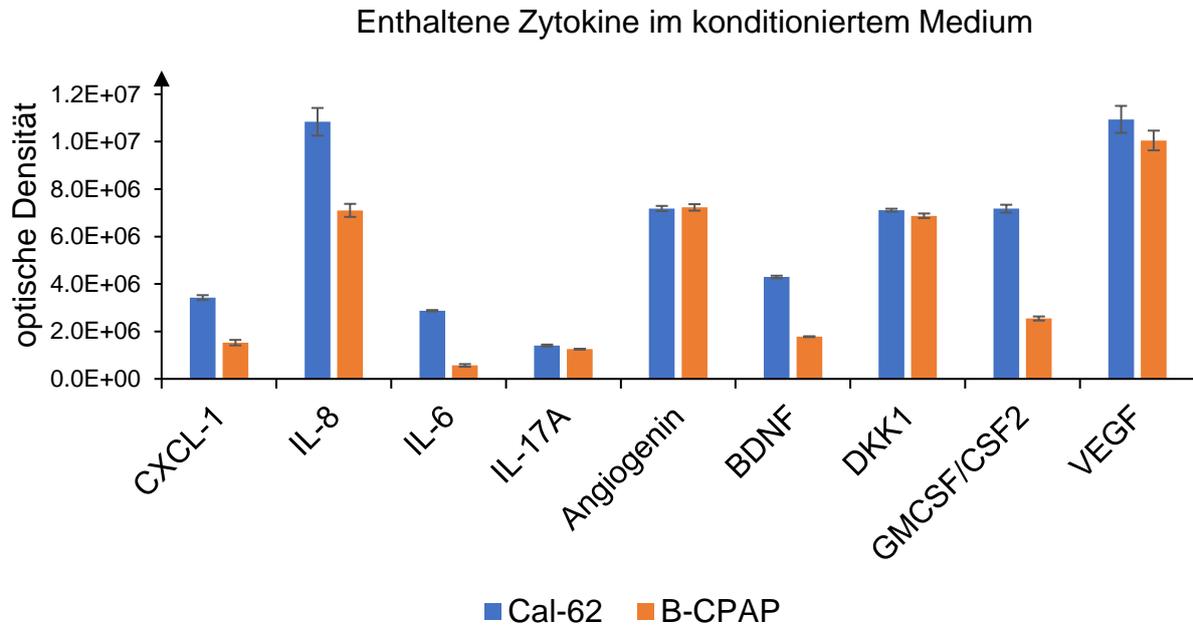
Das konditionierte Medium wurde mittels Proteome Profiler™ – Human XL Cytokine Array auf das semiquantitative Vorhandensein unterschiedlichster Signalbotenstoffe untersucht.



**Abb. 11:** Die konditionierten Medien enthalten eine Reihe von unterschiedlichen Botenstoffen

Das konditionierte Medium wurde mittels Zytokin-Array analysiert: a B-CPAP und b CAL-62. Die einzelnen Messwerte liegen jeweils in Duplikaten vor. Es wurde wie in Kapitel 2.2.2.2 beschrieben vorgegangen.

Wie erwartet konnten viele verschiedene Botenstoffe nachgewiesen werden. Die anaplastische Zelllinie CAL-62 sezernierte quantitativ durchschnittlich höhere Konzentrationen an Signalbotenstoffen. Das Sezernierungsmuster der beiden Zelllinien ähnelte sich im Allgemeinen.



**Abb. 12:** Semiquantitative Auswertung der Botenstoffkonzentrationen im konditionierten Medium

Die bedeutendsten Ergebnisse aus Abbildung 13 wurden mittels ImageJ densitometrisch ausgewertet. Dargestellt ist der absolute Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus den jeweils in Duplikaten angelegten Messwerten, abzüglich des Werts der Negativkontrolle.

### 3.8. Einfluss von IL-8, IL-6, CXCL-1 und Laktat auf das PD-L1-Expressionslevel

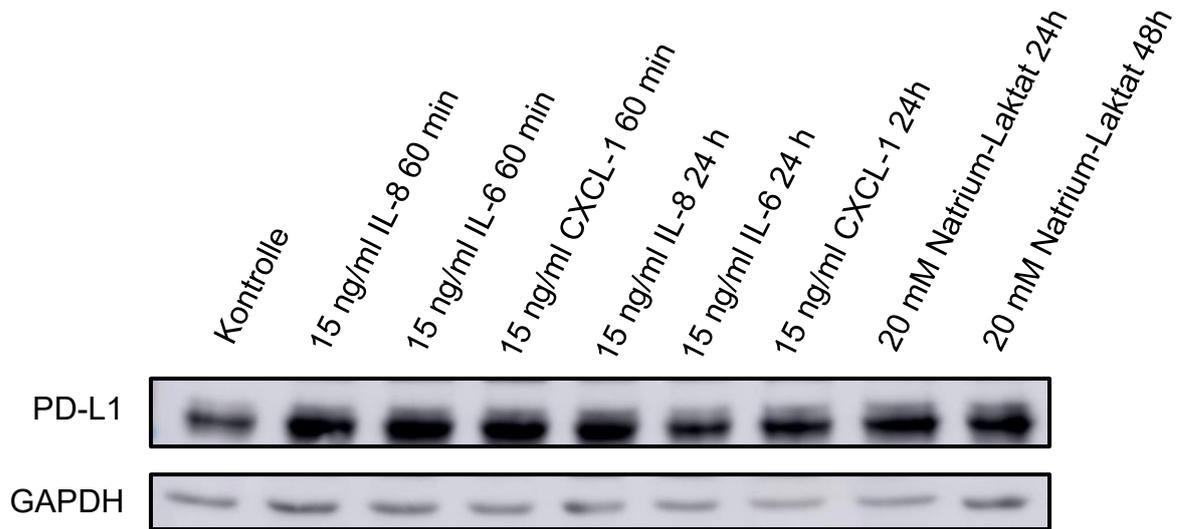
In diesem Schritt wurde der Einfluss von IL-8, IL-6, CXCL-1 und Laktat auf die Expression von PD-L1 genauer untersucht. Jeder dieser Botenstoffe konnte im konditionierten Medium nachgewiesen werden und somit eine endogene Produktion dieser Botenstoffe seitens der Tumorzellen nachgewiesen werden.

#### 3.8.1. Induktion von PD-L1 durch IL-8, IL-6, CXCL-1 und Laktatbehandlung

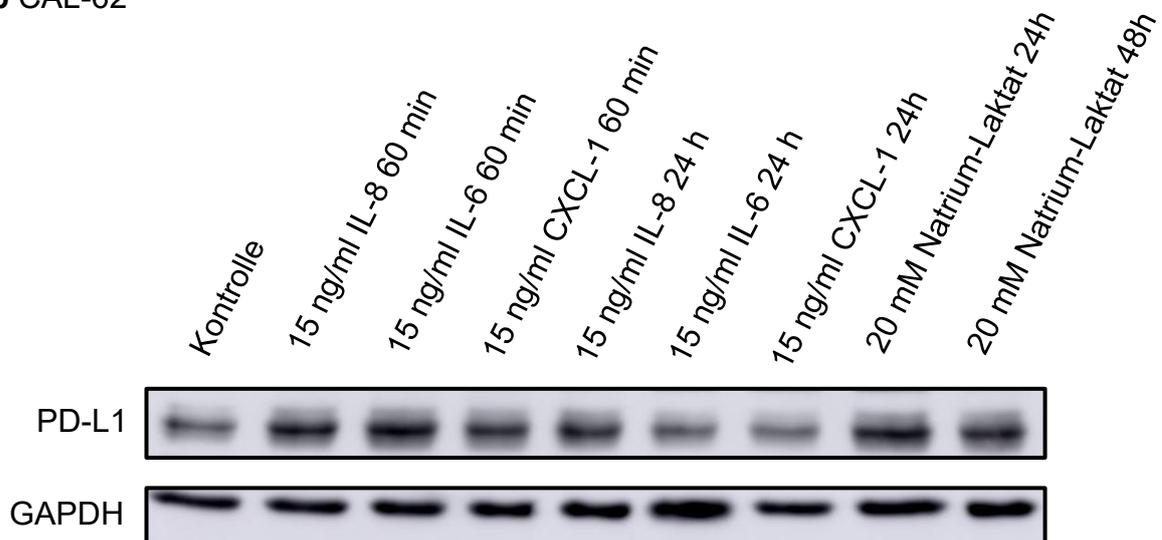
Zunächst sollten die Zellen mit festgelegten Konzentrationen der o.g. Zytokinen oder Laktat behandelt und untersucht werden, welchen Effekt diese Behandlung auf die PD-

L1-Expression hat. Dafür wurde sich für die Konzentrationen der Zytokine an bisheriger wissenschaftlicher Evidenz orientiert (L. Sun et al., 2018) und beim Laktat an den im konditionierten Medium gemessenen Konzentrationen (vgl. Kapitel 3.7.1).

**a** B-CPAP



**b** CAL-62



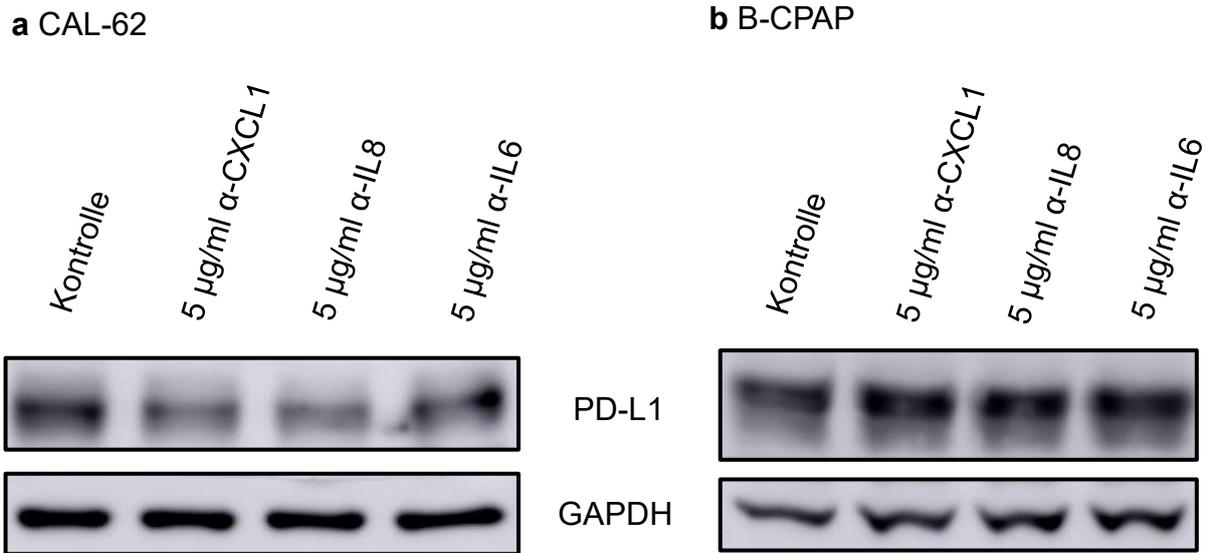
**Abb. 13:** Zytokine und Laktat induzieren PD-L1

Die gewonnen Protein Lysate wurden mittels Western-Blot analysiert: a B-CPAP und b CAL-62. Dargestellt ist ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten.

Es fällt auf, dass alle Zytokine und auch das Laktat eine Induktion von PD-L1 auslösten. Das Ausmaß der Induktion war dabei abhängig vom Zeitpunkt der Lyse und dem jeweiligen Zytokin.

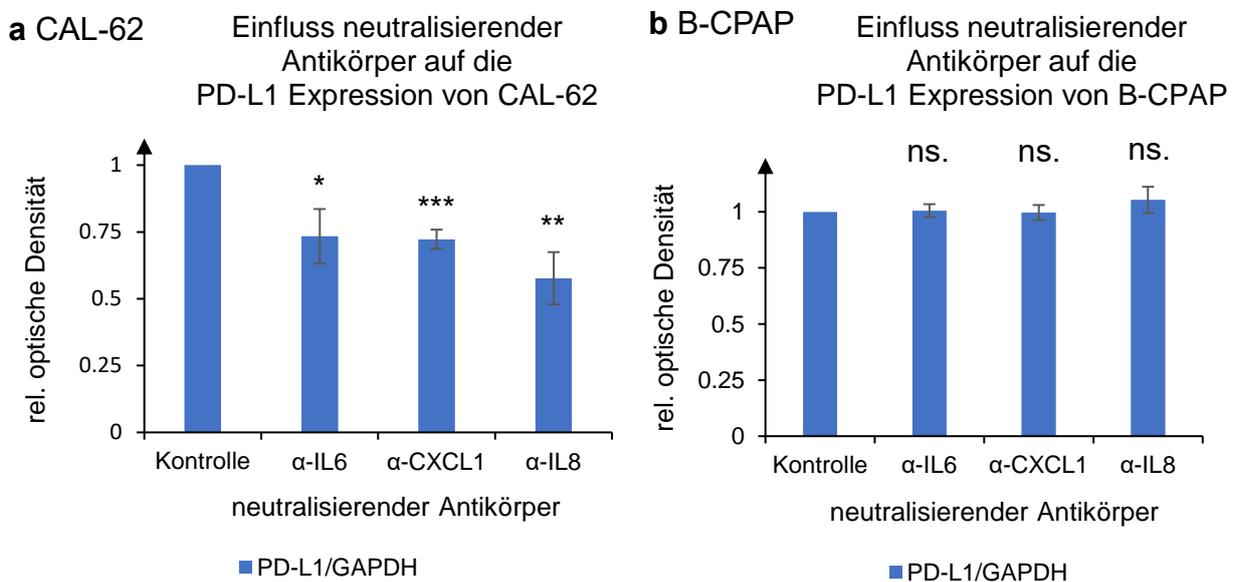
### 3.8.2. Beeinflussung des PD-L1-Levels durch die Behandlung mit IL-8, IL-6 und CXCL-1 neutralisierenden Antikörpern

Nachdem nun im vorigen Versuch gezeigt werden konnte, dass die Zytokine zu einer PD-L1-Induktion führen, sollte in diesem weiterführenden Versuch überprüft werden, ob auch die endogene Produktion dieser Zytokine durch die Tumorzellen selbst ausreichend ist, eine PD-L1-Induktion auszulösen. Die Möglichkeit, mit einer festgelegten Konzentration eines Zytokins eine PD-L1-Induktion auslösen, impliziert nicht notwendigerweise, dass die endogene Produktion der Zellen für selbige Induktion ausreicht. Mittels Zytokin-Array konnte zwar nachgewiesen werden, dass sich diese Zytokine in vergleichsweise relativ hohen Konzentrationen im konditionierten Medium befanden, jedoch liefert das Zytokin-Array keine quantitativ absolute Konzentrationen. In diesem Versuchsteil wurden die Zellen jeweils mit Zytokin neutralisierenden Antikörpern behandelt, um die Interaktion der Zytokine mit ihrem Rezeptor und den nachfolgenden Signalkaskaden zu blockieren. Zum Zeitpunkt  $t_3$  wurden die Zellen dann lysiert und die PD-L1-Expression mit einer Kontrollgruppe, die nicht mit neutralisierenden Antikörpern behandelt wurde, verglichen.



**Abb. 14:** Zytokin-neutralisierende Antikörper führen zu einer PD-L1 Repression bei CAL-62

Die gewonnenen Protein Lysate wurden mittels Western-Blot analysiert: a CAL-62 und b B-CPAP.



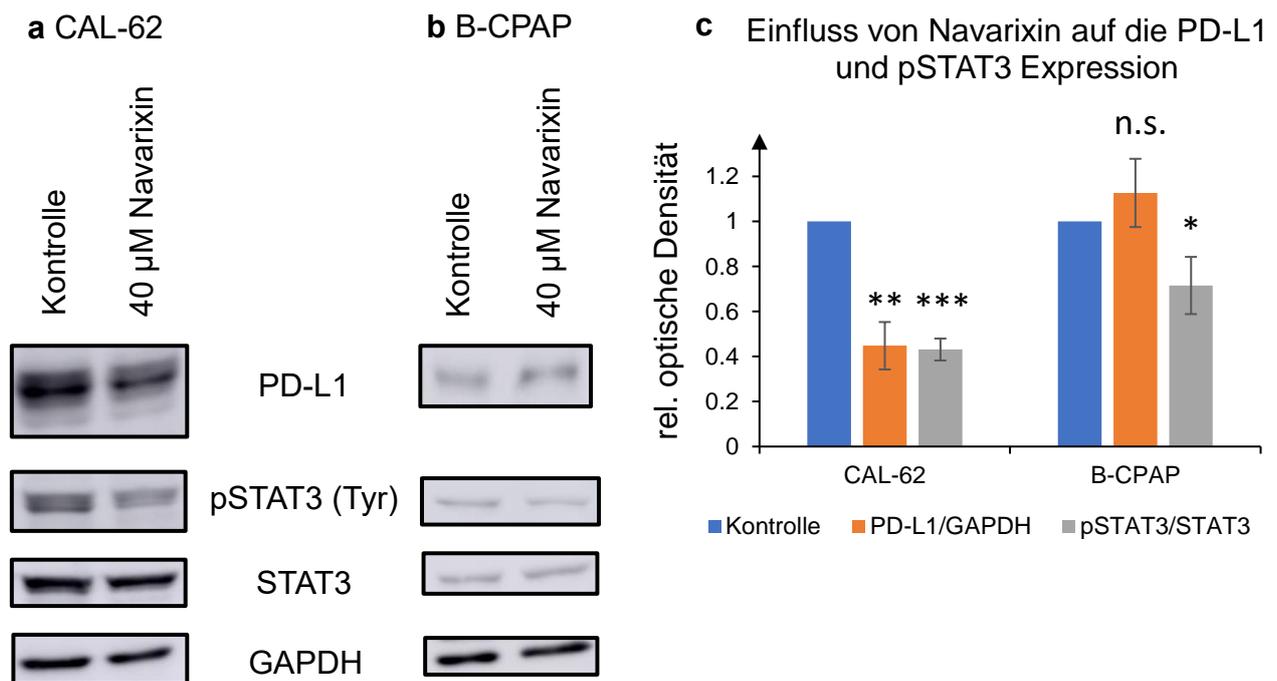
**Abb. 15:** Densitometrische Auswertung der Westernblots des Versuchs mit Zytokin-neutralisierenden Antikörpern

Analyse von a CAL-62 und b B-CPAP: Dargestellt ist der auf die Kontrolle normalisierte Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Das PD-L1-Level wurde anhand von GAPDH normalisiert. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

Alle Zytokin-neutralisierenden Antikörper reduzierten das PD-L1-Expressionslevel der Zelllinie CAL-62, nicht aber der Zelllinie B-CPAP. Am stärksten war der zu beobachtende Effekt beim Interleukin-8, gefolgt vom CXCL-1 und als letztes, aber dennoch signifikant, dem Interleukin-6.

### 3.8.3. Beeinflussung der PD-L1-Expression durch die Behandlung mit dem allosterischen CXCR1/2 Rezeptor-Antagonist Navarixin

Der allosterische Rezeptorinhibitor Navarixin blockiert sowohl den CXCR1 als auch den CXCR2 Rezeptor. An den CXCR1 Rezeptor bindet CXCL-8 (IL-8) und CXCL-6. An den CXCR2 Rezeptor bindet auch CXCL-8 (IL-8), zusätzlich aber noch CXCL-1, CXCL-2, CXCL-3, CXCL-5 und CXCL-7. In diesem Versuch sollten diese Rezeptoren mittels



#### **Abb. 16:** Navarixin reduziert das PD-L1-Level bei CAL-62

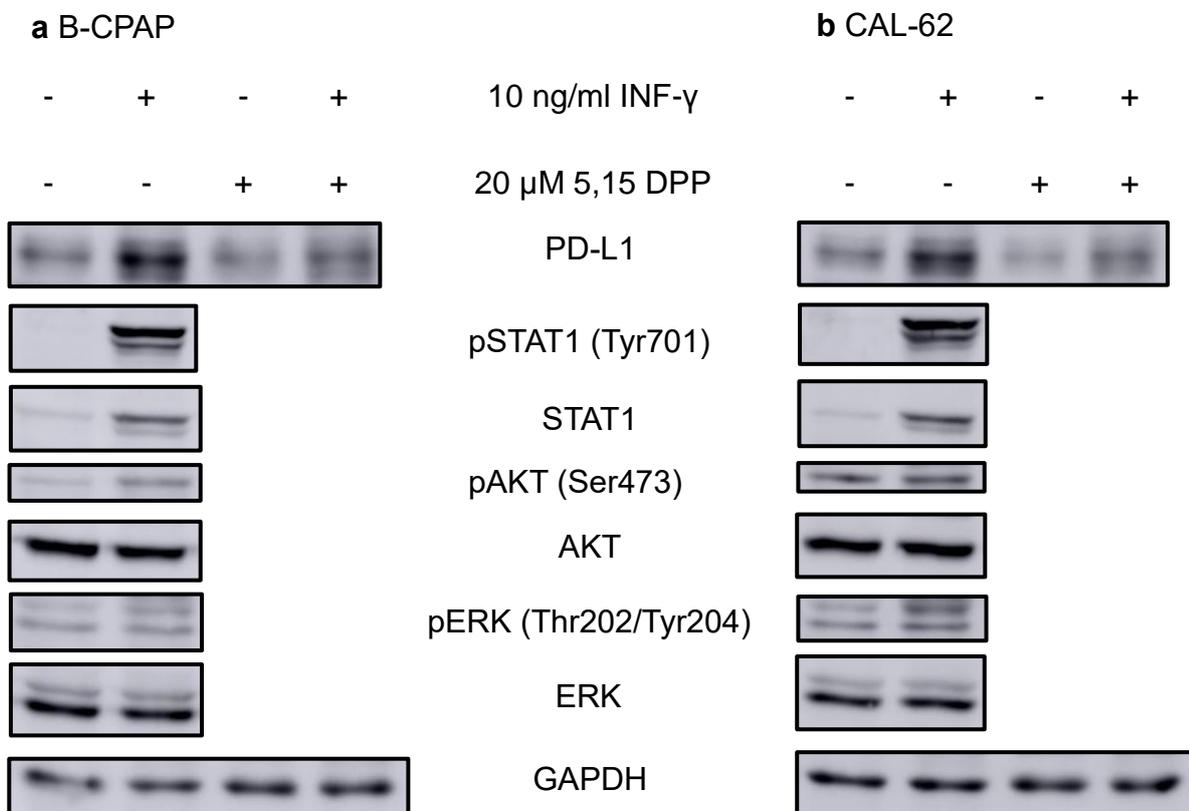
Die gewonnenen Proteinlysate wurden mittels Westernblot analysiert: a CAL-62 und b B-CPAP. Abgebildet ist ein Westernblot von drei unabhängigen Experimenten.

c Densitometrische Analyse von B-CPAP und CAL-62: Dargestellt ist der auf die Kontrolle normalisierte Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Das PD-L1-Level wurde anhand von GAPDH normalisiert. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

Navarixin geblockt werden, um so das Zusammenspiel aller an diesen Rezeptor bindenden Zytokine im Kontext der PD-L1 Regulation zu untersuchen. Wie ersichtlich ist, führte die Behandlung mit Navarixin bei der Zelllinie CAL-62 zu einer Repression des PD-L1-Expressionslevel. Interessanterweise verringerte sich auch das pSTAT3 Level signifikant. Dies stellt erneut einen Hinweis für die Bedeutung dieses Signalwegs für die PD-L1 Regulation dar. Bei der Zelllinie B-CPAP wurde zwar auch der STAT3-Signalweg gehemmt, aber deutlich schwächer. Das PD-L1-Level veränderte sich hingegen nicht signifikant.

### 3.9. PD-L1-Induktion durch Interferon-gamma via STAT1 Signalweg

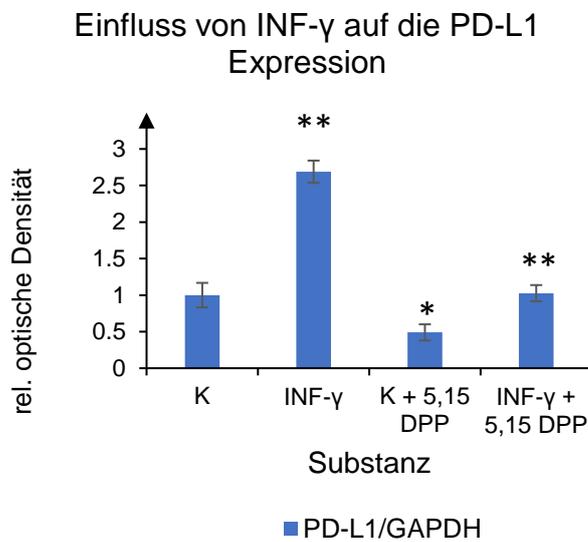
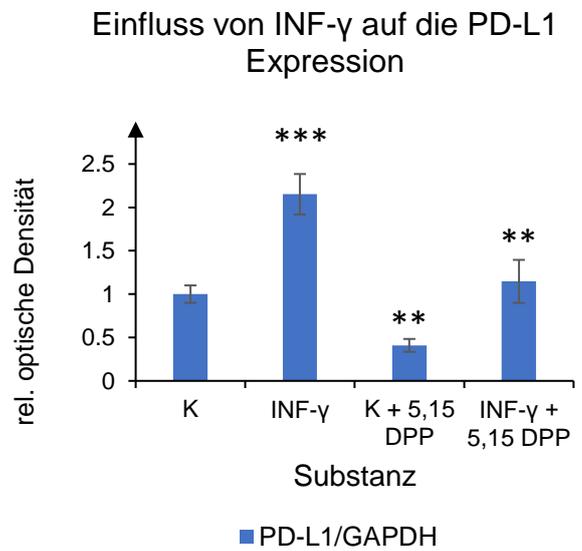
Das Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) wurde zwar nur in Spuren im Zellkulturüberstand gefunden, dennoch wurde in einige Publikationen gezeigt, dass schon bei sehr niedrigen Konzentrationen von IFN- $\gamma$  Tumorzellen in der Lage waren, PD-L1 zu induzieren. Ein weiterer Grund für die Untersuchung war, dass in vielen Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse, wie beispielsweise der Hashimoto-Thyreoiditis, IFN- $\gamma$  eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Auch wenn die folgenden Untersuchungen an Schilddrüsenkarzinomzellen durchgeführt wurde, so sind die Ergebnisse doch ein Indiz dafür, wie diese Regulationsmechanismen im Schilddrüsengewebe einer Immunerkrankung ablaufen könnten. Für die Schilddrüsenkarzinomzelllinien B-CPAP und CAL-62 wurde hier deshalb erstmals der Einfluss dieses Interferons auf die PD-L1-Expression untersucht und auch, inwiefern die Signaltransduktion über den bei anderen Tumorzellen bereits bekannten STAT1 Signalweg läuft. Die Zellen wurden entweder mit IFN- $\gamma$ , dem JAK-STAT Inhibitor 5,15-DPP oder mit einer Kombination aus diesen behandelt. Alle Ansätze inklusive der Kontrollgruppe wiesen den gleichen DMSO-Gehalt/Loch auf. Zum Zeitpunkt  $t_3$  wurden dann alle Zellen lysiert und das PD-L1-Expressionslevel der einzelnen Behandlungsgruppen miteinander verglichen. Da der Hemmstoff 5,15-DPP auch auf die durch endogene Konditionierung der Zellen im Zeitverlauf hochregulierte PD-L1-Expression wirkt, wurde eine Kontrollgruppe ausschließlich mit diesem Inhibitor zwecks Vergleichs behandelt.



**Abb. 17:** IFN- $\gamma$  induziert PD-L1 via STAT1 Signalweg

Die gewonnenen Proteinlysate wurden mittels Westernblot analysiert: a B-CPAP und b CAL-62. Abgebildet ist ein repräsentativer Westernblot von drei unabhängigen Experimenten.

Zu erkennen ist die starke PD-L1-Induktion durch die IFN- $\gamma$  Behandlung bei beiden Zelllinien. Es ist außerdem zu erkennen, dass die Induktion über den STAT-1 Signalwegs vermittelt wird. Das phosphorylierte STAT1 (Tyr) wird durch IFN- $\gamma$  stark induziert, die Elevation des PD-L1 konnte mittels JAK-STAT Inhibitor 5,15-DPP statistisch signifikant reduziert werden. Abermals hat sich auch die Repression des PD-L1 durch den Inhibitor 5,15-DPP auf die endogene PD-L1-Induktion im Zeitverlauf gezeigt.

**a B-CPAP****b CAL-62**

**Abb. 18:** Densitometrische Auswertung der Westernblots zur IFN- $\gamma$  induzierten PD-L1-Expression

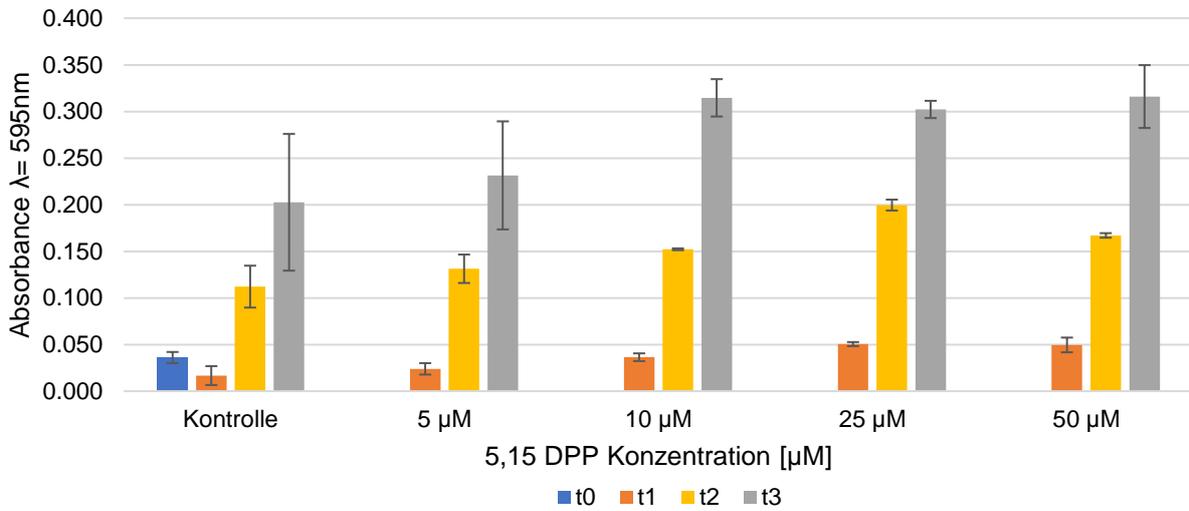
Densitometrische Analyse von a B-CPAP und b CAL-62: Dargestellt ist der auf die Kontrolle normalisierte Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Das PD-L1-Level wurde anhand von GAPDH normalisiert. Zur statistischen Analyse wurde ein ungepaarter, zweiseitiger t-Test durchgeführt: \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001.

### 3.10. Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays

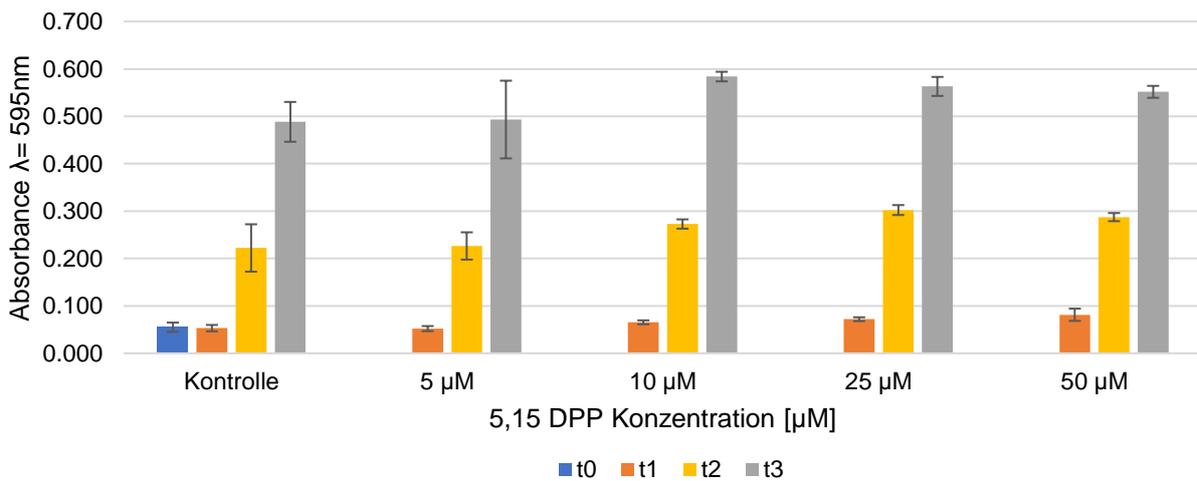
Für verschiedene Substanzen, die noch nicht in der Klinik etabliert waren, wurden Zytotoxizitäts- und Proliferations-Assays mittels Kristallviolett-Färbung durchgeführt. Die Substanzen Sanguinarin und SGI-1776 zeigten beispielsweise bei dieser Untersuchung starke zytotoxische Effekte. Die notwendige Inhibitor-Dosis konnte nicht ohne stark zytotoxische Effekte erreicht werden, sodass mit diesen Substanzen nicht fortgefahren werden konnte. Im Folgenden ist ein Assay beispielhaft für den STAT-Inhibitor 5,15-DPP für B-CPAP und CAL-62 abgebildet:

**a B-CPAP**

## Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay 5,15 DPP

**b CAL-62**

## Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay 5,15 DPP

**Abb. 19:** 5,15-DPP wirkt nicht zelltoxisch

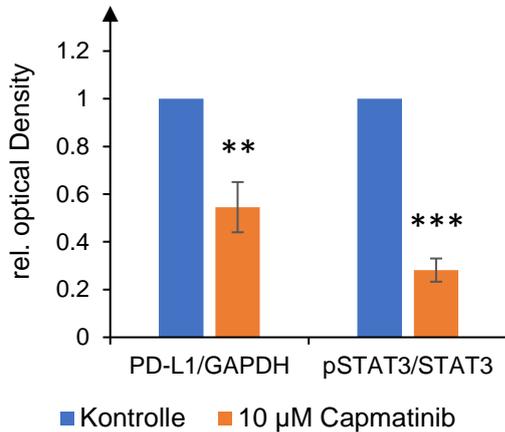
Zytotoxizitäts- und Proliferationsassays von a B-CPAP und b CAL-62: Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Dargestellt sind die Zeitpunkte t0=24h, t1=48 h, t2=72 h und t3=96 h nach Behandlung mit dem Inhibitor 5,15-DPP in unterschiedlichen Konzentrationen.

### 3.11. Ausblick: Medikamentöse Beeinflussung des PD-L1-Expressionslevels

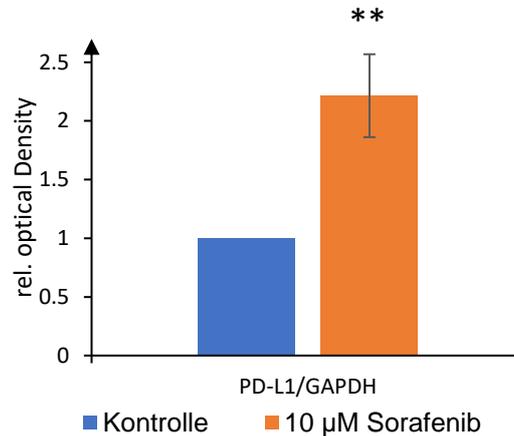
Neben den bisher untersuchten Regulationsmechanismen ergaben sich bereits einige Hinweise darauf, dass auch eine medikamentöse Behandlung der Zellen einen Einfluss auf die PD-L1-Expression haben könnten. So ergab beispielsweise der Inhibitorversuch in Kapitel 3.5 einen Hinweis darauf, dass der Multikinaseinhibitor Sorafenib, der bereits im klinischen Kontext beim therapierefraktären papillären Schilddrüsenkarzinom eingesetzt wird, das PD-L1-Level der Tumorzellen hochreguliert. Für zukünftige Kombinationstherapien mit Immuncheckpoint-Inhibitoren hätte dies einen synergistischen Therapieeffekt. Neben dem Sorafenib wurde für folgende weitere klinische Medikamente getestet, ob sie einen Einfluss auf das PD-L1-Expressionslevel haben: Apelisib (PI3K-Inhibitor), Everolimus (mTOR-Inhibitor), Sunitinib (Rezeptor-Tyrosinkinase-Inhibitor), Capmatinib (cMET-Inhibitor), Ribociclib (CDK-Inhibitor). Für die meisten Medikamente zeigte sich kein signifikanter Einfluss auf die PD-L1-Expression (mindestens n=3 Versuche pro Medikament). Sorafenib zeigte bei den B-CPAP eine starke, signifikante PD-L1-Induktion und Capmatinib eine starke, signifikante Repression des PD-L1-Levels bei der Zelllinie CAL-62. Hier zeigte sich interessanterweise wieder eine Korrelation mit dem JAK-STAT-Signalweg, da durch den Inhibitor das phosphorylierte STAT3 stark abnahm. Der DMSO Gehalt/Loch war zu jedem Zeitpunkt gleich.

**a CAL-62**

Einfluss von Capmatinib auf die PD-L1/pSTAT1 Expression

**b B-CPAP**

Einfluss von Sorafenib auf die PD-L1 Expression

**Abb. 20:** Medikamentöse Behandlung beeinflusst PD-L1-Level

Densitometrische Analyse von a CAL-62 und b B-CPAP: Dargestellt ist der auf die Kontrolle normalisierte Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die Zell Lyse fand zum Zeitpunkt  $t_3=96$  h nach Behandlung mit dem entsprechenden Inhibitor, oder DMSO statt.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die konstitutive und induzierbare PD-L1-Expression

Die Unterscheidung zwischen konstitutiver und induzierbarer PD-L1-Expression ist elementar, da die dahinterstehenden auslösenden Faktoren als distinkte Entitäten zu betrachten sind. Die konstitutive PD-L1-Expression wird vor allem durch dysregulierte, hyperaktive onkogene Signalwege, oder durch dysregulierte Tumorsuppressorgene bestimmt (Ju et al., 2020). Für die induzierbare PD-L1-Expression sind verschiedene in der Tumormikroumgebung vorhandene Botenstoffe verantwortlich, die entweder von tumorinfiltrierenden Immunzellen oder, wie hier gezeigt wurde, von den Tumorzellen selbst produziert werden. Diese Botenstoffe können dann über spezifische Signalwege z.B. inflammatorische Signalwege Einfluss auf die PD-L1-Expression ausüben und nachweislich direkt zur malignen Progression beitragen (LV et al., 2015). Neben diesen zwei Möglichkeiten gibt es noch weitere PD-L1-regulatorische Mechanismen, wie genomische Aberrationen, microRNAs oder posttranslationale Modulationen (C. Sun et al., 2018), auf die im Folgenden aber nicht genauer eingegangen wird. Die Diskussion gliedert sich grundsätzlich nach dem Aufbau des Ergebnisteils. In der folgenden Diskussion soll zum einen auf die Bedeutung der Metabolite für den Schilddrüsenkrebs im Allgemeinen eingegangen werden und anschließend der Bezug zu den Forschungsergebnissen und dem PD-L1 im Speziellen hergestellt werden.

#### 4.1.1. Die konstitutive PD-L1-Expression

Eine Regulation des konstitutiven PD-L1 durch onkogene Signalwege wurde bereits für eine Vielzahl von Tumorentitäten beschrieben, so z.B. für Lymphome, Melanome oder nicht-kleinzellige Lungenkarzinome. Als beschriebene Induktoren wurden unter anderem der MAPK/ERK-, PI3K/AKT- oder der JAK/STAT-Signalweg aufgeführt (Ju et al., 2020). Auch für verschiedene Schilddrüsenkarzinomzelllinien sind Mutationen an wichtigen Schlüsselstellen dieser Signalwege beschrieben. Die Zelllinie B-CPAP trägt beispielsweise die BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation und die Zelllinie CAL-62 die KRAS-Mutation (Landa et al., 2019). Für beide Mutationen wurde bereits gezeigt, dass sie zu einem hyperaktiven MAPK/ERK und PI3K/AKT Signalweg führen können (Saiselet et al., 2012).

Es konnten in den oben beschriebenen Experimenten gezeigt werden, dass sowohl der MAPK/ERK-, als auch der PI3K/AKT- und der JAK/STAT-Signalweg in beiden Zelllinien konstitutiv aktiv sind. Eine Untersuchung des p53 Signalwegs könnte in diesem Kontext vielversprechend sein, da beide Zelllinien eine p53 Mutation aufweisen (Landa et al., 2019). Für diese Mutation wurde bereits eine Regulation des konstitutiven PD-L1 via microRNA-34 in anderen Zelllinien beschrieben (Cortez et al., 2016). Da in den Experimenten der cMET Inhibitor Capmatinib bei der Zelllinie CAL-62 zu einer starken Herunterregulation des PD-L1 führte, gibt dies einen Hinweis darauf, dass der cMET Signalweg bei CAL-62 einen signifikanten Einfluss auf das konstitutive PD-L1 haben könnte. Zu dieser Hypothese passt auch eine Studie, die gezeigt hat, dass in über 95 % der PTCs das MET Protein überexprimiert ist und biologisch konstitutiv aktiv ist (Garcia et al., 2019). Ein weiterer in diesem Kontext gegebenenfalls relevanter Faktor ist der Interferon-Regulationsfaktor (IRF). Für die Lungenkarzinomzelllinie A594 konnte gezeigt werden, dass dieser entscheidend für das konstitutive PD-L1 ist (Ritprajak und Azuma, 2015). Auf Einflussfaktoren, die laut Literatur über den IRF Signalweg wirken und die hier auch für die Zelllinien B-CPAP und CAL-62 untersucht wurden, wie dem IFN- $\gamma$  oder der Gamma-Strahlung, wird später an entsprechender Stelle genauer eingegangen.

#### 4.1.2. Die induzierbare PD-L1-Expression

Unterschiedlichste Botenstoffe können PD-L1 induzieren. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Signalbotenstoffen zu, die sich in unmittelbarer Umgebung der Tumorzellen befinden. Diese Signalbotenstoffe können nämlich durch ihre örtliche Nähe an Rezeptoren der Tumorzellen binden und über die nachgeschaltete Signaltransduktion beispielsweise PD-L1 induzieren. Signalbotenstoffe, die sich in einer engen örtlichen Beziehung zu den Krebszellen befinden, sind in der sogenannten Tumormikroumgebung (TME) lokalisiert. Die TME ist in den letzten Jahren immer mehr ins Zentrum des wissenschaftlichen Interesses gerückt. Die TME umfasst in ihrer Gesamtheit sowohl zelluläre, als auch physische Bestandteile (Zhao et al., 2019). Neben den Tumor infiltrierenden Immunzellen gehören zu der TME auch sezernierte Faktoren wie beispielsweise Laktat oder auch Zytokine. Bisher ist man davon ausgegangen, dass ein Großteil dieser Signalbotenstoffe von tumorinfiltrierenden Lymphozyten stammt. Es gibt bereits einige Hinweise, dass auch Tumorzellen in der Lage sind, Signalbotenstoffe

autokrin zu sezernieren (LV et al., 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit untermauern diese These.

#### 4.1.2.1. Bedeutung des konditionierten Mediums

Durch Behandlung der Zelllinien B-CAP und CAL-62 mit ihrem jeweiligen konditionierten Medium konnte eine starke PD-L1-Induktion gezeigt werden. Dieses Experiment lässt keine Schlussfolgerung auf die Anzahl und die Namen der spezifischen Substanzen, welche für diese PD-L1-Induktion verantwortlich sind, zu. Es hat als eine Art Screening-Untersuchung dennoch einen Stellenwert und lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Summe aller Einflüsse im konditionierten Medium bei beiden Zelllinien eine PD-L1 induzierende Wirkung zur Folge hatte. Durch die Inhibitorversuche konnte gezeigt werden, dass sowohl bei der exogenen, als auch bei der endogenen Konditionierung der JAK/STAT Signalweg in Bezug auf die PD-L1-Induktion entscheidend zu sein scheint. Der MEK/ERK Signalweg spielt demnach nur bei der PD-L1-Induktion der Zelllinie B-CPAP eine entscheidende Rolle. Dieser Zusammenhang zeigte sich sowohl bei der exogenen, als auch bei der endogenen Konditionierung. Dies liegt vermutlich an der BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation, auf deren Bedeutung in Kapitel 4.1.2.3.1. genauer eingegangen wird.

#### 4.1.2.2. Bedeutung von Gamma-Strahlung

Sato et al. konnten 2017 für diverse Zelllinien zeigen, dass ionisierende Strahlung über DNA-Doppelstrangbrüche und das DNA-Reparatursystem zu einer PD-L1-Hochregulation führt. Es konnte im Gegensatz dazu weder bei der Zelllinie B-CPAP, noch bei der Zelllinie CAL-62 eine PD-L1-Hochregulation nach Bestrahlung festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte sein, dass das DNA-Reparatursystem in den Schilddrüsenkarzinomzelllinien anders aufgebaut ist bzw. andere Signalwege aktiviert, die nicht mit der PD-L1 Regulation zusammenhängen. Ein anderer Grund könnten Unterschiede in der Bestrahlungstechnik sein. Obwohl davon auszugehen ist, dass sowohl die hier beschriebene als auch die Bestrahlung der Zellen nach dem Protokoll von Sato et. al. zu Doppelstrangbrüchen führt, könnten dennoch Unterschiede in der Dosisrate einen unterschiedlichen Effekt auf die Zellen haben. Die Zellen wurden hier mit 6 MeV und einer Dosisrate von 24 Gy/min, bestrahlt, wohingegen Sato et. al. die Zellen mit 100 keV und einer Dosisrate von 0,5 Gy/min bestrahlte. Diese Verfahren sind also dosimetrisch und physikalisch gleich, da 6 MeV Photonen die gleiche biologische Wirksamkeit wie 100keV Photonen haben. Die

unterschiedliche Dosisrate könnte dennoch einen anderen Effekt auf die Zellen haben. Leider war es mit dem zur Verfügung stehenden Bestrahlungsgerät nicht möglich, genau nach dem Protokoll von Sato et al. vorzugehen. Es zeigen sich dennoch interessante Parallelen zu den Ergebnissen. So spielte, wie bei den Versuchen dieser Arbeit, der JAK/STAT Signalweg eine wichtige Rolle. Sato et al. konnten zeigen, dass die PD-L1-Induktion nach Bestrahlung über den STAT1- und den STAT3-Signalweg vermittelt wurde. Sato et al. konnten, ebenso wie in dieser Arbeit, eine vermehrte Apoptose der Zellen als Ursache für die PD-L1-Induktion ausschließen.

#### 4.1.2.3. Bedeutung von Zytokinen

Stassi et al. konnten 2003 für Schilddrüsenkrebsgewebe eine autokrine Produktion von IL-4 und IL-10 nachweisen, die nachgeschaltet über eine Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> Hochregulation eine Chemotherapie Resistenz auslöste. Im oben erwähnten Zytokin-Array konnte keine autokrine Produktion von IL-4, oder IL-6 für die Zelllinien B-CPAP und CAL-62 nachgewiesen werden. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass im komplex aufgebauten Schilddrüsenkrebsgewebe andere Regulationsmechanismen wirken als in der Zellkultur der Zelllinien B-CPAP und CAL-62. Es könnte aber auch ein Hinweis darauf sein, dass die Signalbotenstoffe im Schilddrüsenkrebsgewebe von den tumorinfiltrierenden Lymphozyten und nicht vom Schilddrüsenkrebs selbst stammen.

Welchen Einfluss autokrin produzierte Zytokine auf das PD-L1-Expressionslevel in den Zelllinien B-CPAP und CAL-62 haben, ist bisher noch ungeklärt. Es konnte durch direkte Behandlung dieser Schilddrüsenkarzinomzelllinien mit CXCL-8, CXCL1 und IL-6 eine PD-L1-Induktion nachgewiesen werden. Die Blockade des CXCR1/2 Rezeptor, an den unter anderem CXCL-8 und CXCL-1 bindet, führte in den Experimenten bei der Zelllinie CAL-62 zu einer signifikanten Reduktion des PD-L1-Levels. Ebenso führte hier auch eine direkte Blockade der Zytokine CXCL-8, CXCL-1 und IL-6 mittels monoklonaler Antikörper zu einer Reduktion des PD-L1-Expressionslevels. Diese zwei Experimente sind in sich konsistent und sprechen für eine bedeutende Rolle dieser Zytokine für die PD-L1-Expression bei der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie CAL-62. Bei der Zelllinie B-CPAP zeigte sich zwar auch eine direkte PD-L1-Induktion durch Behandlung der Zellen mit den Zytokinen CXCL-8, CXCL-1 und IL-6, die Blockade des CXCR1/2 Rezeptors und die Blockade der Zytokine direkt mittels monoklonaler Antikörper zeigten allerdings keine

signifikante Veränderung der PD-L1-Expression. Für die Diskrepanz des ersten Versuchs mit den letzten beiden gibt es mehrere Erklärungsansätze. Es könnte sein, dass die endogene, autokrine Produktion des jeweiligen Zytokins der B-CPAP Zellen in ihrer Konzentration nicht ausreicht, um den Schwellenwert des Regulationsmechanismus zu erreichen. Die PD-L1-Induktion würde bei dieser Hypothese nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ ablaufen. Die direkte Gabe des jeweiligen Zytokins hat zu einer Induktion geführt, weil der Schwellenwert mit der gewählten Konzentration mutmaßlich überschritten wurde. Um diese Hypothese zu untermauern, sollten in einem nächsten Schritt quantitativ die genauen Konzentrationen der Zytokine im Zellkulturüberstand gemessen werden (beispielsweise mittels ELISA). Ein anderer Erklärungsansatz wäre, dass die Mechanismen der PD-L1 Regulation in der Zelllinie B-CPAP komplexer ablaufen und gleichzeitig mit der PD-L1-Induktion etwaige Kompensationsmechanismen in Gang gesetzt werden, die noch nicht ausreichend verstanden sind.

#### 4.1.2.3.1. Die besondere Bedeutung von Interleukin-8 (IL-8, CXCL-8)

Im Folgenden soll insbesondere auf das Interleukin 8 (CXCL-8) eingegangen werden, da es sich in den Versuchen als einer der höchstkonzentriertesten Botenstoffe im konditionierten Medium und als potenter PD-L1 Induktor herausgestellt hat. Des Weiteren wurden bereits einige vielversprechende Studien veröffentlicht, die die herausragende Rolle dieses Zytokins für die Karzinogenese des Schilddrüsenkarzinoms herausstellen. Es konnte in einer Studie gezeigt werden, dass es bei einer Behandlung von Mäusen mit rekombinanten IL-8, die zuvor B-CPAP Tumorzellen transplantiert bekommen haben, zu einer stärkeren metastatischen Ausbreitung dieser Tumorzellen und zu einer geringeren Lebenszeit der tumortransplantierten Tiere kam (Fang et al., 2014). Im Zuge der Frage nach der Ursache konnten in Studien für IL-8 bereits mehrere protumorigene Effekte nachgewiesen werden, unter anderem pro-angiogenetische und zyto-proliferative Effekte (Coperchini et al., 2019). Die verstärkte metastatische Ausbreitung ist demnach auf die gesteigerte Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) unter IL-8 Behandlung zurückzuführen. EMT ist ein Prozess, bei dem epitheliale Tumorzellen ihre Adhäsionseigenschaft verlieren und einen mesenchymalen Phänotyp ausbilden, der ihnen ein invasives und metastasierendes Wachstum ermöglicht. Durch die Experimente dieser Arbeit konnte ein neuer, weiterer protumorigener Faktor ermittelt werden: Eine PD-

L1-Hochregulation unter IL-8. Diese Hochregulation ermöglicht den Tumorzellen voraussichtlich eine verstärkte Immunevasion und trägt damit indirekt zum Tumorprogress bei. Für beide Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sie endogen relativ hohe Konzentrationen an IL-8 autokrin produzieren und sezernieren. Für die Zelllinie CAL-62 konnte sogar gezeigt werden, dass die endogene IL-8 Produktion der Tumorzellen selbst ausreicht, um den Mechanismus der PD-L1-Hochregulation zu initiieren. Ähnliche Ergebnisse zeigten Experimente mit Magenkrebszellen (L. Sun et al., 2018). Auch hier führte eine durch Magenkrebsstammzellen autokrine Sezernierung von IL-8/IL-6 zu einer PD-L1-Hochregulation der Magenkrebszellen. Diese PD-L1-Hochregulation konnte ebenfalls durch Zugabe von IL-8/IL-6 neutralisierender Antikörper negiert werden. Eine PD-L1-Hochregulation konnte, wie auch in dieser Arbeit, direkt durch exogene Zugabe von rekombinanten IL-8/IL-6 getriggert werden. Die Signaltransduktion lief in dieser Studie über den JAK/STAT Signalweg. Für die Schilddrüsenkarzinomzelllinien B-CPAP und CAL-62 sind weitere Experimente nötig, um herauszufinden über welche Signalwege die Signaltransduktion von IL-8 und IL-6 zur PD-L1-Induktion führt.

Bauerle et al. haben 2014 eine interessante Studie über die Bedeutung von IL-8 für die Tumorprogression von Schilddrüsenkrebszellen durchgeführt. Sie konnten eine autokrine IL-8 Sekretion als wichtigen Effekt stromabwärts des NF- $\kappa$ B Signalwegs feststellen: Sie zeigten dies dadurch, dass die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand von den Schilddrüsenkarzinomzelllinien B-CPAP und 8505C durch Transfektion dieser mit dem Vektor mlkB $\alpha$ , welcher ein direkter, dominanter Inhibitor des NF- $\kappa$ B darstellt, um mehr als die Hälfte sank. Ein weiterführendes *in-vivo* Mausmodell ergab, dass eine NF- $\kappa$ B Inhibition signifikant die Tumorgöße von Schilddrüsenkrebsmetastasen verminderte und zu einer Lebenszeitverlängerung der behandelten Mäuse führte. Auf histopathologischer Ebene der Tumorzellen konnte jedoch überraschenderweise kein direkter Effekt auf die Zellproliferation, oder den Zelltod der B-CPAP Tumorzellen nachgewiesen werden. Man fragte sich deshalb, worauf die Tumorgößenreduktion zurückzuführen war. Ein genannter Erklärungsversuch waren die durch die IL-8 Sekretionsreduktion ausgelösten anti-angiogenetischen Signale. Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass ein weiterer Mechanismus zu Grunde liegt: Durch die geringere IL-8 Konzentration ist anzunehmen, dass es im Zeitverlauf zu einer Herunterregulation des PD-L1-Levels und somit zu einer endogenen Reaktivierung des mauseigenen Immunsystems kommt und der Tumor somit

besser erkannt und bekämpft werden kann. Schlussendlich würde diese indirekte Reaktivierung zu einer Tumorgrößenreduktion führen, die im Einklang mit den beobachteten fehlenden direkten Veränderungen auf histopathologischer Ebene der untersuchten Tumorzellen steht. Interessant war weiterhin, dass IL-8 Konzentrationen in Schilddrüsenkarzinomzelllinien signifikant höher als in Schilddrüsenzelllinien nicht-tumorösen Ursprungs waren. Unter den Schilddrüsenkarzinomzelllinien ergab sich weiterhin eine negative Korrelation zwischen dem Differenzierungsgrad und der endogenen, autokrinen IL-8 Produktion. Schlecht differenzierte anaplastische „high-risk“ Schilddrüsenkarzinomzelllinien zeigten höhere IL-8 Spiegel als Schilddrüsenkarzinomzelllinien differenzierten Ursprungs. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen bezüglich des Zytokin-Arrays, der Neutralisierung der endogenen IL-8 Wirkung und des CXCR1/2 Rezeptor-Inhibitorversuchs mittels Navarixin. Da die Zelllinie CAL-62 im Gegensatz zur gut differenzierten Tumorzelllinie B-CPAP anaplastischen Ursprungs ist, weist sie vermutlich eine höhere endogene IL-8 Produktion auf, was auch der Zytokin-Array-Versuch nahelegt. Dies erklärt den größeren Effekt der Neutralisierungsversuche bezogen auf das PD-L1-Expressionslevel bei der Zelllinie CAL-62 im Vergleich zur Zelllinie B-CPAP, wenn eine Regulierung nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ anzunehmen ist. Auch andere Signalwege neben dem NF- $\kappa$ B Signalweg scheinen mit der IL-8 Sekretion assoziiert zu sein: Eine andere Studie zeigt einen Zusammenhang zwischen der BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation der Zelllinie B-CPAP und ihrer IL-8 Sekretion (Coperchini et al., 2019). Eine Inhibition dieses Signalwegs führte zu einer signifikanten Reduktion der IL-8 Sekretion. In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass das durch Behandlung mit konditioniertem Medium elevierte PD-L1-Level der Zelllinie B-CPAP mittels MEK Inhibitor U0126 stark erniedrigt werden konnte. Ob und inwiefern diese Repression des MAPK/ERK-Signalwegs von der damit vermutlich einhergehenden IL-8 Sekretionsrepression abhängt, werden weitere Experimente zeigen müssen. Das der MEK-Inhibitor in den Versuchen ausschließlich bei der Zelllinie B-CPAP repressiv auf das PD-L1-Level wirkte, nicht aber bei der Zelllinie CAL-62, ist jedoch ein starker Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation und dem PD-L1-Level, da diese Mutation laut Literatur (Landa et al., 2019) lediglich die Zelllinie B-CPAP trägt. Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass papilläre Schilddrüsenkarzinome mit BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation durchschnittlich eine höhere Expression

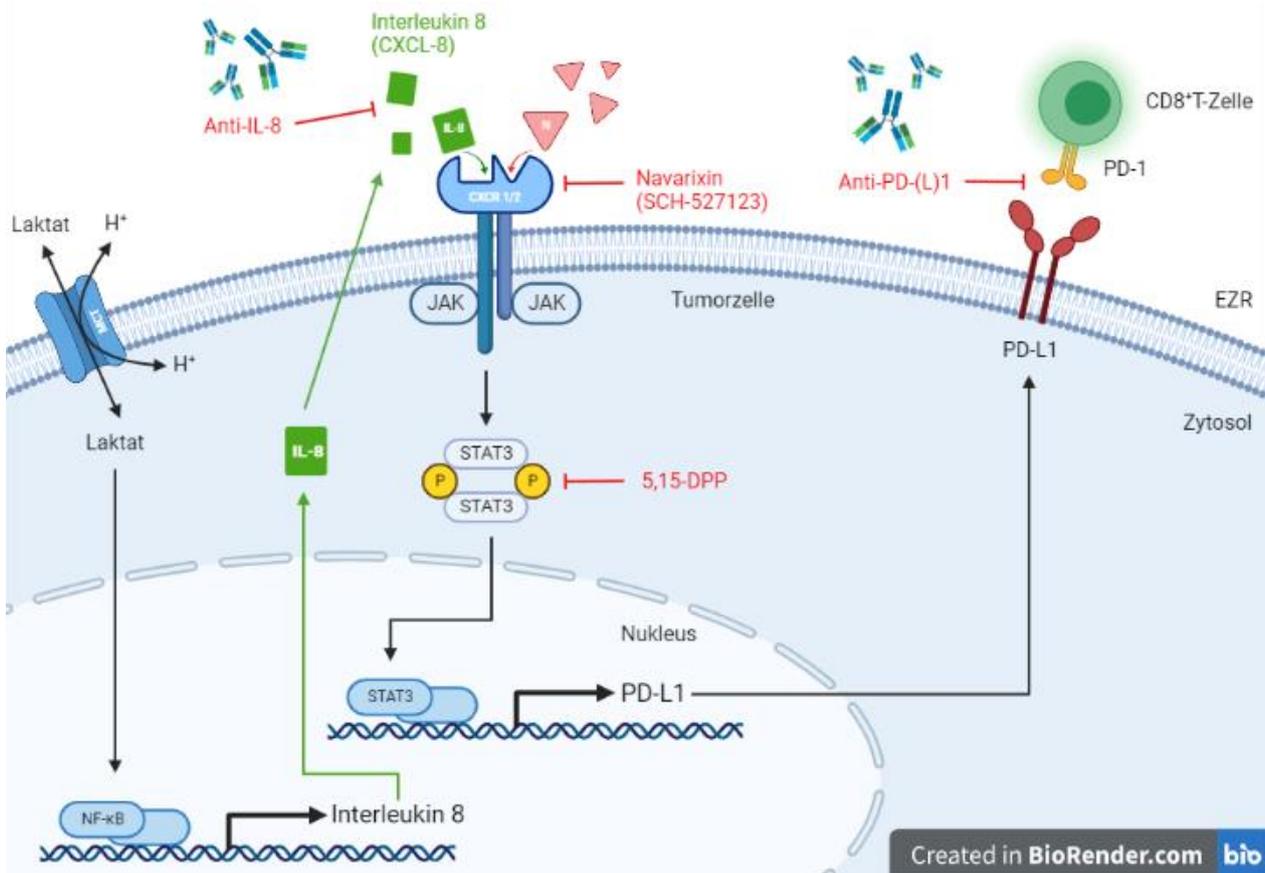
an Immuncheckpoints wie CTLA-4 oder PD-L1 aufwiesen (Na und Choi, 2018). Dass es einen Zusammenhang zwischen IL-8 und PD-L1 gibt, zeigen auch bereits klinische Studien. Sanmamed et al. konnten z.B. 2017 in einer Studie zeigen, dass die IL-8 Serumkonzentrationsänderung nach Therapiebeginn mit einem PD-L1 Immun-Checkpoint-Inhibitor den weiteren Therapieverlauf vorhersagen konnte. Ein Abfall der IL-8 Konzentration war mit einem guten Therapieverlauf assoziiert, wohingegen ein Anstieg mit einem schlechten Therapieverlauf assoziiert war. Die Höhe des basalen IL-8 Levels zu Beginn der Therapie hatte interessanterweise keine Aussagekraft über das spätere Therapieansprechen. Ein großes Problem solcher Studien ist, dass die Serumkonzentration von IL-8 oft nicht die Verhältnisse in der TME widerspiegelt. Andere Studien konnten nämlich zeigen, dass trotz hoher IL-8 Spiegel in der TME der Serum-IL-8 Spiegel sehr niedrig war (Bauerle et al., 2014). Gerade diese unmittelbare Nähe des Zytokins IL-8 zu den Tumorzellen ist aber laut den Ergebnissen dieser Arbeit elementar wichtig für die PD-L1 Regulationsmechanismen. Trotzdem geben diese Studien einen Hinweis darauf, dass Serum IL-8 und Ansprechen auf eine PD-L1 Immuntherapie eng miteinander verknüpft sind. Weitere, größere Studien sind nötig, um den Zusammenhang zwischen IL-8 im Serum, IL-8 in der TME und die Rolle von allen Faktoren in Kombination als Prädiktor für das Ansprechen auf eine PD-L1 Immuncheckpoint-Therapie zu klären. Unsere Ergebnisse in Kombination mit der bisherigen wissenschaftlichen Evidenz zeigen insgesamt, dass eine zielgerichtete Therapie gegen IL-8 auf multimodaler Ebene erfolgsversprechend in die Tumorgenese des Schilddrüsenkarzinoms eingreifen kann. Hier ist vor allem die zukünftige Bedeutung dieser Therapie beim anaplastischen Schilddrüsenkarzinom hervorzuheben, da bei diesem zum einen Therapiealternativen bisher rar sind und zum anderen die Experimente eine besondere Rolle des IL-8 für das PD-L1-Level bei der anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzelllinie CAL-62 herausgestellt haben.

#### 4.1.2.4. Bedeutung der endogenen Laktatproduktion

Laktat ist allseits bekannt als Endprodukt der anaeroben Glykolyse, die auch bei gesunden Zellen bei Hypoxie abläuft. Im Kontext der Tumorgenese ist der sogenannte Warburg-Effekt von Interesse. Der Warburg-Effekt bezeichnet eine beobachtete Veränderung des Glukose-Stoffwechsels in Tumorzellen. Anstatt ihren ATP-Bedarf über

den Citratzyklus und die Atmungskette, also aerob zu decken, decken Tumorzellen oft ihren Energiebedarf hauptsächlich über die anaerobe Glykolyse und das trotz normoxischer Umgebungsbedingungen. Die Energiebilanz der anaeroben Glykolyse ist deutlich schlechter als die der aeroben Glykolyse: Während aus einem Molekül Glukose in der aeroben Glykolyse 32 Moleküle ATP gewonnen werden können, sind es in der anaeroben Glykolyse netto lediglich 2 Moleküle ATP. Die anaerobe Glykolyse hat trotz schlechterer Energiebilanz Vorteile für den Tumor. Für das bei der anaeroben Glykolyse entstehende Laktat konnten beispielsweise bereits einige protumorigene Effekte gezeigt werden: Es induziert die EMT der Tumorzellen, steigert die Angiogenese und führt als Radikalfänger zu einer Resistenz gegenüber gängiger Tumorthérapien wie ionisierender Strahlung oder Chemotherapeutika. Des Weiteren fördert es den Prozess der Inflammation in der TME (Yabu et al., 2011). Die physiologische Konzentration von Laktat im Blut und gesundem Gewebe beträgt ungefähr 1,5 bis 3 mM. In Tumorzellgewebe hingegen wurden Konzentrationen zwischen 10-30 mM gemessen (de la Cruz-López et al., 2019). Es konnten in den Experimenten hohe Laktatkonzentrationen von im Mittel 15 mM bei der Zelllinie B-CPAP und 22 mM bei der Zelllinie CAL-62 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Für die Zelllinie B-CPAP wurde der Warburg-Effekt bereits nachgewiesen (Coelho et al., 2016). Die Ergebnisse dieser Arbeit sprechen dafür, dass der Warburg-Effekt bei beiden Zelllinien eine Rolle spielt. Es konnte zudem ein weiterer, wichtiger Effekt des Laktats nachgewiesen werden: Eine Behandlung der Zellen mit Laktat in der Konzentration des im konditionierten Medium gemessenen Laktatspiegels führte bei beiden Zelllinien zu einer signifikanten Elevation des PD-L1-Levels. Eine PD-L1-Induktion durch Laktat konnte bereits für Lungenkarzinome und Hals- Kopfkärzinome nachgewiesen werden (Feng et al., 2017; Verma et al., 2020). Interessant ist auch die Signaltransduktion von Laktat. Es sind bereits mehrere Signalwege bekannt, die durch Laktat aktiviert werden. Beispielsweise wurde für Laktat eine Transduktion via NF- $\kappa$ B beschrieben, die wiederum zu einer VEGF- und IL-8 Sekretion führt. Beide Signalstoffe wirken pro-angiogenetisch und für das IL-8 konnte in den Experimenten dieser Arbeit auch eine PD-L1 induzierende Wirkung nachgewiesen werden. Im Einklang damit konnte VEGF und IL-8 in hohen Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Zelllinien B-CPAP und CAL-62 nachgewiesen werden. Denkbar ist, wie bereits für andere Zelllinien gezeigt wurde, eine Hochregulation des PD-L1 via HIF-1 $\alpha$  Signalweg (Wang et al., 2018).

Weitere Versuche werden zeigen müssen, wie diese Mediatoren und Signalwege in Relation zueinander stehen. Ein denkbarer, aus den Ergebnissen und Recherchen herleitbarer Zusammenhang, könnte bei der Zelllinie CAL-62 wie folgt aussehen:



**Abb. 21:** Möglicher Signaltransduktionsweg von IL-8 und Laktat bei CAL-62

Abgebildet ist eine mögliche Signaltransduktion, die mittels der Ergebnisse und Recherche möglich scheint. Mit den roten Inhibitoren könnte präklinisch in die Signaltransduktion eingegriffen werden. Auch eine Inhibition mittels PD-L1 Antikörper ist möglich, wurde aber in den Versuchen nicht getestet.

#### 4.1.2.5. Bedeutung von Interferon-gamma

Es konnte bereits für einige Tumorentitäten eine Hochregulation des PD-L1 unter INF- $\gamma$  Behandlung gezeigt werden, so z.B. beim Pankreaskarzinom, beim kolorektalem Karzinom oder beim malignen Melanom (Ju et al., 2020; C. Sun et al., 2018; Wang et al., 2018). Bezüglich der Funktionen von INF- $\gamma$  für Tumorzellen im Allgemeinen lässt sich sagen, dass es bei Tumorzellen, wie auch das zuvor beschriebene IL-8, über einen Cadherin-Turnover von E-Cadherin zu N-Cadherin die EMT induziert. INF- $\gamma$  ermöglicht

damit Metastasierung und invasives Wachstum von Krebszellen (LV et al., 2015). Es ist bereits seit einiger Zeit bekannt, dass PD-L1 unter Immunaktivierung und Inflammation induziert wird (Wang et al., 2018). INF- $\gamma$  stellt dabei als pro-inflammatorischer Mediator den prominentesten löslichen PD-L1 Induktor dar (C. Sun et al., 2018). Bisher nahm man an, dass die reaktiven, tumorinfiltrierenden Lymphozyten, wie CD4+/CD8+ T-Zellen, oder natürliche Killerzellen die Quelle des INF- $\gamma$  sind (Chen et al., 2019; Mansoor und Magtooph, 2019). Mittels des Zytokin-Array-Versuchs konnte gezeigt werden, dass die Schilddrüsenkarzinomzelllinien B-CPAP und CAL-62 autokrin INF- $\gamma$  produzieren und sekretieren. Die PD-L1-Signaltransduktion findet laut diverser Studien hauptsächlich über den STAT1-Signalweg statt. So führte ein Knockout von STAT1 mittels siRNA, nicht aber ein Knock-down von STAT3, zu einer reduzierten INF- $\gamma$  abhängigen PD-L1-Induktion in diversen Tumorzelllinien (Chen et al., 2019). Es sind jedoch auch andere Signalwege bekannt, über die INF- $\gamma$  PD-L1 induziert, wie etwa der PI3K/AKT/mTOR-Signalweg beim Ovarialkarzinom (Gao et al., 2019), der NF- $\kappa$ B-Signalweg beim malignen Melanom (Gowrishankar et al., 2015), oder der MAPK/ERK-Signalweg beim multiplem Myelom (Liu et al., 2007). In den Versuchen zeigte sich hauptsächlich eine sehr starke Aktivierung des STAT1 Signalwegs durch die INF- $\gamma$  Behandlung. Zwar wurden auch andere Signalwege wie der PI3K/AKT Signalweg aktiviert, jedoch in einem viel geringeren Ausmaß. Eine Inhibition des STAT1-Signalwegs mittels des Hemmstoffs 5,15-DPP führte zu einer signifikanten Repression des durch INF- $\gamma$  induzierten PD-L1-Expressionslevels. Dieses Ergebnis bestätigte die Hypothese, dass der STAT1 Signalweg maßgeblich an der INF- $\gamma$  abhängigen PD-L1-Induktion beteiligt ist.

Auch in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielt INF- $\gamma$  eine entscheidende Rolle: So konnte bereits gezeigt werden, dass ein Immunangriff auf die Darmmukosa via INF- $\gamma$  Freisetzung zu einer PD-L1-Hochregulation der Darmmukosa führt. Dadurch bildet diese eine Art „Immunschild“ aus, um sich im Kontext der chronischen Inflammation vor dem autoimmunen Angriff zu schützen (Patel und Kurzrock, 2015). Die Ergebnisse dieser Arbeit geben interessante Hinweise auf einen möglichen krankheitslimitierenden Faktor im Rahmen von autoimmunen Schilddrüsenerkrankungen. Durch die Herkunft aus dem gleichen Ursprungsgewebe ist anzunehmen, dass auch in normalen Schilddrüsenzellen INF- $\gamma$  zu einer Induktion von PD-L1 führt. Im Rahmen einer Schilddrüsen-Autoimmunerkrankung, wie dem Morbus Basedow oder der Hashimoto Thyreoiditis,

würde ein solcher Regulationsmechanismus einen krankheitslimitierenden Faktor darstellen. Dies liegt daran, dass durch die Hochregulierung immunsuppressiver Proteine, wie dem PD-L1, fehlgeleitete Immunzellen in ihrem destruktiven Verhalten gebremst werden würden. Diese Hypothese bestätigen bereits durchgeführte Experimente in denen transgenen Mäusen, INF- $\gamma$  neutralisierende monoklonale Antikörper gespritzt wurden. Durch die Neutralisierung von INF- $\gamma$  kam es zu einer Exazerbation der autoimmunen Thyreoiditis (Barin et al., 2003).

#### 4.2. Die besondere Bedeutung des JAK/STAT-Signalwegs

Über alle Versuche hinweg stellte sich der JAK/STAT Signalweg konsistent als wichtigster Signalweg in Bezug auf die PD-L1 Regulation dar. Sowohl bei der endogenen Konditionierung als auch bei der exogenen PD-L1-Induktion durch Behandlung mit konditioniertem Medium konnte das PD-L1-Expressionslevel mittels des JAK/STAT-Hemmstoffs 5,15 DPP negiert werden. Ebenso konnte das nach INF- $\gamma$ -Behandlung induzierte PD-L1 mittels 5,15 DPP negiert werden. Der CXCR1/2-Inhibitor Navarixin und der cMET-Inhibitor Capmatinib zeigten bei CAL-62 sowohl eine deutliche Reduktion des PD-L1 als auch des pSTAT3. All diese Experimente zeigen auf, dass der JAK/STAT-Signalweg bei den Zelllinien B-CPAP und CAL-62 eine herausragende Rolle in Bezug auf die PD-L1 Regulation hat. Kein anderer Signalweginhibitor hat in den Experimenten über beide Zelllinien hinweg einen solch großen Einfluss gehabt. Auch bisher durchgeführte Studien können die Bedeutung des JAK/STAT Signalwegs in Bezug auf die PD-L1 Regulation weiter untermauern. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch eine Inaktivierung des JAK1/2-Proteins, die beide an der Signaltransduktion des JAK/STAT-Signalwegs maßgeblich beteiligt sind, eine PD-L1 Repression auf den Tumorzellen und eine Resistenz gegen PD-L1 Immuncheckpoint Inhibitoren induziert wird (Shin et al., 2017). Laut anderen Studien reguliert der JAK/STAT-Signalweg die Hochregulation von PD-L1 in Pankreas-, Magen-, Kopf und Hals-Karzinomen (Zhao et al., 2020). Um die Signaltransduktion über den JAK-STAT-Signalweg genauer zu verstehen, ist ein Verständnis der unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen wichtig. Neben der Tyrosin Phosphorylierungsstelle (Tyr705) gibt es außerdem noch eine Serin-Phosphorylierungsstelle (Ser727). Phosphorylierung am Tyr705 führt zu einer Homodimerisierung von STAT1/3, nuklearer Translokation dieses Komplexes und der

DNA-Bindung mit nachfolgender Transkription der Zielgene. Unter anderem wird durch den JAK/STAT-Signalweg die Transkription des IRF induziert, der wiederum an den PD-L1-Promoter bindet und die PD-L1-Expression induziert (C. Sun et al., 2018). Die Serin-Phosphorylierungsstelle ist wichtig für das Ausmaß der Transkriptionsaktivität der Zielgene. So konnte beispielsweise in Zellen mit mutierter STAT1 Serin-Phosphorylierungsstelle trotz normaler Phosphorylierung am Tyrosin nur eine 20 % so starke INF- $\gamma$ -abhängige Transkriptionsaktivität der Zielgene gemessen werden (Wen et al., 1995). Dies verdeutlicht die Wichtigkeit der Serin-Phosphorylierung. Dennoch ist die Phosphorylierung am Tyrosin die notwendige Bedingung dafür, dass die Phosphorylierung am Serin einen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität haben kann. In den letzten Jahren hat sich die Ansicht dazu verändert: Der Serin-Phosphorylierung werden nun auch unabhängig von der Tyrosin-Phosphorylierung eigene Funktionen und Aufgaben zugerechnet (Sakaguchi et al., 2012). In den Versuchen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen dem Expressionslevel der Serin- und Tyrosin-Phosphorylierungsstelle, sodass in den Abbildungen jeweils nur die Tyrosin-Phosphorylierung abgebildet wird.

## **5. Zusammenfassung**

Diese Arbeit startete mit dem PD-L1 und CTLA-4 mRNA-Screening diverser Tumorentitäten, die zeigte, dass fast alle Tumorentitäten PD-L1-mRNA exprimierten, aber nur sehr wenige CTLA-4-mRNA. Der anschließende Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wurde auf der Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Faktoren auf das PD-L1-Expressionslevel zweier Schilddrüsenkarzinomzelllinien, nämlich B-CPAP und CAL-62, gesetzt. Eine Bestrahlung dieser Zellen mit Gamma-Strahlung bzw. die dadurch induzierten Doppelstrangbrüche zeigten keinen Effekt auf das PD-L1-Expressionslevel. Bei der Zelllinie B-CPAP zeigte sich interessanterweise eine kontinuierliche Hochregulation des PD-L1-Levels im Zeitverlauf. Die Behandlung beider Zelllinien mit konditioniertem Medium führte zu einer signifikanten Elevation des PD-L1-Levels. Störfaktoren wie zunehmende Dichte der Zellen, oder induzierte Apoptose durch Nährstoffmangel konnten als Ursache der Hochregulation ausgeschlossen werden. Dies

ließ die Schlussfolgerung zu, dass das Zusammenspiel aller im konditionierten Medium enthaltenen Substanzen insgesamt zu einer PD-L1-Induktion führt. Als durchweg für beide Zelllinien relevant zeigte sich bei dieser Induktion der JAK/STAT Signalweg, da die Inhibition dieses Signalwegs die Induktion abschwächen konnte. Um den Einfluss spezifischer Substanzen herauszuarbeiten, wurde anschließend eine Analyse der im konditionierten Medium enthaltenen Signalbotenstoffe durchgeführt. Es zeigte sich, dass eine Vielfalt von Botenstoffen autokrin von den Tumorzelllinien selbst sezerniert wurden und dass sich das dabei festgestellte Sezernierungsprofil der beiden Zelllinien ähnelte. Nach Recherche wurden solche im konditionierten Medium enthaltenen Signalbotenstoffe für weitere Experimente ausgewählt, für die in der Literatur bereits für andere Tumorzelllinien einen Effekt auf das PD-L1-Level beschrieben wurde: CXCL-8, CXCL1, IL-6, INF- $\gamma$  und Laktat. Bei direkter Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen konnte für die Zelllinien B-CPAP und CAL-62 eine signifikante Elevation des PD-L1-Levels gezeigt werden, die jedoch im Ausmaß abhängig vom jeweiligen Zytokin und dem betrachteten Zeitpunkt nach Behandlung war. Für die Behandlung mit INF- $\gamma$  konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die Signaltransduktion über den STAT1 Signalweg stattfindet. Nun sollte untersucht werden, ob die durch die Tumorzellen endogen produzierten Zytokine CXCL-8, CXCL-1 und IL-6 in Ihrer Konzentration ausreichen, um ebenfalls eine Induktion des PD-L1-Levels zu bewirken. Dazu wurden diese Zytokine jeweils durch spezifische monoklonale Antikörper neutralisiert. Hierbei zeigte sich bei der Zelllinie CAL-62 bei allen Botenstoffen, bei der Zelllinien B-CPAP bei keinem Botenstoff eine signifikante Herunterregulation des PD-L1-Levels. Konsistent mit diesem Ergebnis war der Inhibitionsversuch des CXCL1/2 Rezeptors. Hierbei zeigte sich auch lediglich bei der Zelllinie CAL-62 eine signifikante Herunterregulation des PD-L1-Levels. Dass eine direkte Behandlung der Zelllinie B-CPAP mit CXCL-8, CXCL-1 oder IL-6 zu einer PD-L1-Induktion führte, nicht aber die Blockade der endogenen Konditionierung, ließ sich dadurch erklären, dass bei dieser Zelllinie entweder weitere Regulationsmechanismen existieren müssen, oder die endogen produzierten Zytokine nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ in ihrer Konzentration nicht ausreichen, um das PD-L1 zu induzieren.

## 5.1. Ausblick

Weitere Experimente in Bezug auf die genauen Prozesse der Signaltransduktion der Zytokine CXCL-8, CXCL-1, IL-6 sind nötig, um zum einen ein besseres Verständnis für die PD-L1 Regulationsmechanismen zu erlangen, aber auch um therapeutisch gezielt in die Signaltransduktion eingreifen zu können. Eine genaue Konzentrationsbestimmung der endogen produzierten Zytokine könnte hilfreich sein, um die Ursachen des fehlenden Ansprechens der Neutralisierungsversuche der Zelllinie B-CPAP einzugrenzen.

## 6. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Schema des Blot-Sandwich.....	45
<b>Abbildung 2:</b> Fotodokumentation der PCR PD-L1/CTLA-4 Screening-Ergebnisse .....	52
<b>Abbildung 3:</b> Zeitachse zum Ablauf der Gammabestrahlung .....	53
<b>Abbildung 4:</b> Bestrahlungsunabhängige PD-L1-Induktion von B-CPAP im Zeitverlauf.	54
<b>Abbildung 5:</b> Einfluss von Apoptose, Zelldichte und sezernierten Botenstoffen auf die PD-L1-Expression von B-CPAP.....	55
<b>Abbildung 6:</b> Konditioniertes Medium induziert PD-L1 .....	57
<b>Abbildung 7:</b> Einfluss von Signalweginhibitoren auf die endogene und exogene PD-L1-Induktion .....	59
<b>Abbildung 8:</b> Densitometrische Auswertung der Westernblots zur Signalweginhibitor-Behandlung.....	61
<b>Abbildung 9:</b> Die Signalweginhibitoren inhibieren jeweils ihren Signalweg und beeinflussen nicht die anderen Signalwege.....	63
<b>Abbildung 10:</b> Sowohl das konditionierte Medium von B-CPAP, als auch das der Zelllinie CAL-62 weist eine hohe Laktatkonzentration auf. ....	64
<b>Abbildung 11:</b> Die konditionierten Medien enthalten eine Reihe von unterschiedlichen Botenstoffen.....	65
<b>Abbildung 12:</b> Semiquantitative Auswertung der Botenstoffkonzentrationen im konditionierten Medium .....	66
<b>Abbildung 13:</b> Zytokine und Laktat induzieren PD-L1.....	67
<b>Abbildung 14:</b> Zytokin-neutralisierende Antikörper führen zu einer PD-L1 Repression bei CAL-62 .....	69
<b>Abbildung 15:</b> Densitometrische Auswertung der Westernblots des Versuchs mit Zytokin-neutralisierenden Antikörpern.....	69
<b>Abbildung 16:</b> Navarixin reduziert das PD-L1-Level bei CAL-62 .....	70
<b>Abbildung 17:</b> IFN- $\gamma$ induziert PD-L1 via STAT1 Signalweg.....	72
<b>Abbildung 18:</b> Densitometrische Auswertung der Westernblots zur IFN- $\gamma$ induzierten PD-L1-Expression.....	73
<b>Abbildung 19:</b> 5,15-DPP wirkt nicht zelltoxisch.....	74
<b>Abbildung 20:</b> Medikamentöse Behandlung beeinflusst PD-L1-Level .....	76
<b>Abbildung 21:</b> Möglicher Signaltransduktionsweg von IL-8 und Laktat bei CAL-62.....	86

## 7. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Geräte.....	22
<b>Tabelle 2:</b> Verbrauchsmaterialien .....	23
<b>Tabelle 3:</b> Software.....	24
<b>Tabelle 4:</b> Chemikalien und Reagenzien .....	24
<b>Tabelle 5:</b> Zytokine und Zytokin neutralisierende Antikörper .....	26
<b>Tabelle 6:</b> Vorklinische Signalweginhibitoren .....	26
<b>Tabelle 7:</b> Klinische Signalweginhibitoren .....	26
<b>Tabelle 8:</b> Kommerzielle Fertigsysteme „Kits“ .....	29
<b>Tabelle 9:</b> Enzyme und Größenstandards .....	29
<b>Tabelle 10:</b> Primärantikörper für den Westernblot .....	29
<b>Tabelle 11:</b> Sekundärantikörper für den Westernblot .....	30
<b>Tabelle 12:</b> Oligonukleotid-Primer für die PCR .....	31
<b>Tabelle 13:</b> Elektronische Datenbanken .....	31
<b>Tabelle 14:</b> Referenz der Zelllinien des PD-L1 und CTLA-4 mRNA-Screenings .....	32
<b>Tabelle 15:</b> Mastermix für die reverse Transkription.....	36
<b>Tabelle 16:</b> Reaktionsansatz für die reverse Transkription.....	37
<b>Tabelle 17:</b> Programmablaufplan der reversen Transkription.....	37
<b>Tabelle 18:</b> Reaktionsansatz für die Polymerasekettenreaktion .....	38
<b>Tabelle 19:</b> Programmablaufplan der Polymerasekettenreaktion .....	39
<b>Tabelle 20:</b> BSA-Standardreihe .....	41
<b>Tabelle 21:</b> Pipettierschema BSA-Assay .....	42
<b>Tabelle 22:</b> Ergebnisse der CTLA-4 und PD-L1-RNA-Screenings.....	50

## 8. Literaturverzeichnis

Accardo G, Conzo G, Esposito D, Gambardella C, Mazzella M, Castaldo F, et al. Genetics of medullary thyroid cancer: An overview. *Int J Surg Lond Engl* 2017; 41: 2–6

Almozyan S, Colak D, Mansour F, Alaiya A, Al-Harazi O, Qattan A, et al. PD-L1 promotes OCT4 and Nanog expression in breast cancer stem cells by sustaining PI3K/AKT pathway activation. *Int J Cancer* 2017; 141: 1402–1412.

Ambrosetti MC, Colato C, Dardano A, Monzani F, Ferdeghini M. Radioiodine ablation: when and how. *Q J Nucl Med Mol Imaging Off Publ Ital Assoc Nucl Med AIMN Int Assoc Radiopharmacol IAR Sect Soc Of* 2009; 53: 473–481.

Antonelli A, Fallahi P, Ferrari SM, Carpi A, Berti P, Materazzi G, et al. Dedifferentiated thyroid cancer: a therapeutic challenge. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2008; 62: 559–563.

Bardhan K, Anagnostou T, Boussiotis VA. The PD1:PD-L1/2 Pathway from Discovery to Clinical Implementation. *Front Immunol* 2016; 7: 550.

Barin JG, Afanasyeva M, Talor MV, Rose NR, Burek CL, Caturegli P. Thyroid-specific expression of IFN-gamma limits experimental autoimmune thyroiditis by suppressing lymphocyte activation in cervical lymph nodes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2003; 170: 5523–5529.

Bauerle KT, Schweppe RE, Lund G, Kotnis G, Deep G, Agarwal R, et al. Nuclear Factor  $\kappa$ B–Dependent Regulation of Angiogenesis, and Metastasis in an In Vivo Model of Thyroid Cancer Is Associated With Secreted Interleukin-8. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99: 1436–1444.

Birch DE, Kolmodin L, Wong J, Zangenberg GA, Zoccoli MA, McKinney N, et al. Simplified hot start PCR. *Nature* 1996; 381: 445–446.

Bonnefond S, Davies T. Thyroid Cancer—Risks and Causes. *Oncol Hematol Rev* 2014; 102: 144–151.

Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al. Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* 2015; 373: 1627–1639.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.

Brose MS, Cabanillas ME, Cohen EEW, Wirth LJ, Riehl T, Yue H, et al. Vemurafenib in patients with BRAF(V600E)-positive metastatic or unresectable papillary thyroid cancer refractory to radioactive iodine: a non-randomised, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2016; 17: 1272–1282.

Cargnello M, Roux PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* 2011; 75: 50–83.

Cerezo M, Guemiri R, Druillennec S, Girault I, Malka-Mahieu H, Shen S, et al. Translational control of tumor immune escape via the eIF4F-STAT1-PD-L1 axis in melanoma. *Nat Med* 2018; 24: 1877–1886.

Chen S, Crabill GA, Pritchard TS, McMiller TL, Wei P, Pardoll DM, et al. Mechanisms regulating PD-L1-Expression on tumor and immune cells. *J Immunother Cancer* 2019; 7: 305.

Coelho RG, Cazarin J de M, Cavalcanti de Albuquerque JPA, de Andrade BM, Carvalho DP. Differential glycolytic profile and Warburg effect in papillary thyroid carcinoma cell lines. *Oncol Rep* 2016; 36: 3673–3681.

Coperchini F, Croce L, Denegri M, Awwad O, Ngnitejeu ST, Muzza M, et al. The BRAF-inhibitor PLX4720 inhibits CXCL8 secretion in BRAFV600E mutated and normal thyroid cells: a further anti-cancer effect of BRAF-inhibitors. *Sci Rep* 2019; 9: 4390.

Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, Wang X, Peltier HJ, Ye Y, et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108: 303.

de la Cruz-López KG, Castro-Muñoz LJ, Reyes-Hernández DO, García-Carrancá A, Manzo-Merino J. Lactate in the Regulation of Tumor Microenvironment and Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 2019; 9: 1143.

De Leo S, Trevisan M, Fugazzola L. Recent advances in the management of anaplastic thyroid cancer. *Thyroid Res* 2020; 13: 17.

Fang W, Ye L, Shen L, Cai J, Huang F, Wei Q, et al. Tumor-associated macrophages promote the metastatic potential of thyroid papillary cancer by releasing CXCL8. *Carcinogenesis* 2014; 35: 1780–1787.

Fehrenbacher L, Spira A, Ballinger M, Kowanetz M, Vansteenkiste J, Mazieres J, et al. Atezolizumab versus docetaxel for patients with previously treated non-small-cell lung cancer (POPLAR): a multicentre, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Lond Engl* 2016; 387: 1837–1846.

Feldt-Rasmussen U. Hashimoto's thyroiditis as a risk factor for thyroid cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2020; 27: 364–371.

Feng J, Yang H, Zhang Y, Wei H, Zhu Z, Zhu B, et al. Tumor cell-derived lactate induces TAZ-dependent upregulation of PD-L1 through GPR81 in human lung cancer cells. *Oncogene* 2017; 36: 5829–5839.

Ferrari SM, Fallahi P, Galdiero MR, Ruffilli I, Elia G, Ragusa F, et al. Immune and Inflammatory Cells in Thyroid Cancer Microenvironment. *Int J Mol Sci* 2019; 20: 441-443.

Fresno Vara JA, Casado E, de Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30: 193–204.

Gao H, Zhang J, Ren X. PD-L1 regulates tumorigenesis and autophagy of ovarian cancer by activating mTORC signaling. *Biosci Rep* 2019; 39: 201-209.

Garcia C, Buffet C, El Khattabi L, Rizk-Rabin M, Perlemoine K, Ragazzon B, et al. MET overexpression and activation favors invasiveness in a model of anaplastic thyroid cancer. *Oncotarget* 2019; 10: 2320–2334.

Garnett MJ, Marais R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell* 2004; 6: 313–319.

Gowrishankar K, Gunatilake D, Gallagher SJ, Tiffen J, Rizos H, Hersey P. Inducible but not constitutive expression of PD-L1 in human melanoma cells is dependent on activation of NF- $\kappa$ B. *PloS One* 2015; 10: 123-130.

Ho AL, Grewal RK, Leboeuf R, Sherman EJ, Pfister DG, Deandreis D, et al. Selumetinib-enhanced radioiodine uptake in advanced thyroid cancer. *N Engl J Med* 2013; 368: 623–632.

Hundahl SA, Cady B, Cunningham MP, Mazzaferri E, McKee RF, Rosai J, et al. Initial results from a prospective cohort study of 5583 cases of thyroid carcinoma treated in the united states during 1996. U.S. and German Thyroid Cancer Study Group. An American College of Surgeons Commission on Cancer Patient Care Evaluation study. *Cancer* 2000; 89: 202–217.

Iglesias ML, Schmidt A, Ghuzlan AA, Lacroix L, Vathaire F de, Chevillard S, et al. Radiation exposure and thyroid cancer: a review. *Arch Endocrinol Metab* 2017; 61: 180–187.

Inigo L, T I, L B, R S, Ja K, Rh S, et al. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest* 2016; 126.

Ju X, Zhang H, Zhou Z, Wang Q. Regulation of PD-L1-Expression in cancer and clinical implications in immunotherapy. *Am J Cancer Res* 2020; 10: 1–11.

Kato H, Yamashita K, Enomoto T, Watanabe M. Classification and General Considerations of Thyroid Cancer 2015; 9: 1-15.

Kim KB, Cabanillas ME, Lazar AJ, Williams MD, Sanders DL, Ilagan JL, et al. Clinical responses to vemurafenib in patients with metastatic papillary thyroid cancer harboring BRAF(V600E) mutation. *Thyroid Off J Am Thyroid Assoc* 2013; 23: 1277–1283.

Kitahara CM, K Rmendingé Farkas D, Jørgensen JOL, Cronin-Fenton D, Sørensen HT. Benign Thyroid Diseases and Risk of Thyroid Cancer: A Nationwide Cohort Study. *J Clin Endocrinol Metab* 2018; 103: 2216–2224.

Laha D, Nilubol N, Boufraquech M. New Therapies for Advanced Thyroid Cancer. *Front Endocrinol* 2020; 11: 82.

Landa I, Pozdeyev N, Korch C, Marlow LA, Smallridge RC, Copland JA, et al. Comprehensive genetic characterization of human thyroid cancer cell lines: a validated panel for preclinical studies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2019; 25: 3141–3151.

Li W, Ain KB. Human sodium–iodide symporter (hNIS) gene expression is inhibited by a trans-active transcriptional repressor, NIS-repressor, containing PARP-1 in thyroid cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2010; 17: 383–398.

Liu J, Hamrouni A, Wolowiec D, Coiteux V, Kuliczowski K, Hetuin D, et al. Plasma cells from multiple myeloma patients express B7-H1 (PD-L1) and increase expression after stimulation with IFN- $\gamma$  and TLR ligands via a MyD88-, TRAF6-, and MEK-dependent pathway. *Blood* 2007; 110: 296–304.

LV N, GAO Y, GUAN H, WU D, DING S, TENG W, et al. Inflammatory mediators, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interferon- $\gamma$ , induce EMT in human PTC cell lines. *Oncol Lett* 2015; 10: 2591–2597.

Mansoor A-H, Magtooph M. The Role of Interferon (IFN-  $\gamma$ ) in thyroid autoimmunity. *J Coll Educ PURE Sci* 2019; 9: 221–226.

Myung S-K, Lee CW, Lee J, Kim J, Kim HS. Risk Factors for Thyroid Cancer: A Hospital-Based Case-Control Study in Korean Adults. *Cancer Res Treat Off J Korean Cancer Assoc* 2017; 49: 70–78.

Na KJ, Choi H. Immune landscape of papillary thyroid cancer and immunotherapeutic implications. *Endocr Relat Cancer* 2018; 25: 523–531.

Owonikoko TK, Zhang G, Lallani SB, Chen Z, Martinson DE, Khuri FR, et al. Evaluation of preclinical efficacy of everolimus and pasireotide in thyroid cancer cell lines and xenograft models. *PloS One* 2019; 14: 206-309.

Papanastasiou A, Sapsalidis K, Goulis DG, Michalopoulos N, Mareti E, Mantalovas S, et al. Thyroid nodules as a risk factor for thyroid cancer in patients with Graves' disease: A systematic review and meta-analysis of observational studies in surgically treated patients. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2019; 91: 571–577.

Patel SP, Kurzrock R. PD-L1-Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 847–856.

Prete A, Borges de Souza P, Censi S, Muzza M, Nucci N, Sponziello M. Update on Fundamental Mechanisms of Thyroid Cancer. *Front Endocrinol* 2020; 11: 102.

Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015; 51: 221–228.

Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med* 2015; 372: 320–330.

Rosenberg JE, Hoffman-Censits J, Powles T, van der Heijden MS, Balar AV, Necchi A, et al. Atezolizumab in patients with locally advanced and metastatic urothelial carcinoma who have progressed following treatment with platinum-based chemotherapy: a single-arm, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Lond Engl* 2016; 387: 1909–1920.

Rothenberg SM, McFadden DG, Palmer EL, Daniels GH, Wirth LJ. Redifferentiation of iodine-refractory BRAF V600E-mutant metastatic papillary thyroid cancer with dabrafenib. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2015; 21: 1028–1035.

Saiselet M, Floor S, Tarabichi M, Dom G, Hébrant A, van Staveren WCG, et al. Thyroid cancer cell lines: an overview. *Front Endocrinol* 2012; 3: 133.

Saji M, Ringel MD. THE PI3K-AKT-mTOR PATHWAY IN INITIATION AND PROGRESSION OF THYROID TUMORS. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 321: 20–28.

Sakaguchi M, Oka M, Iwasaki T, Fukami Y, Nishigori C. Role and Regulation of STAT3 Phosphorylation at Ser727 in Melanocytes and Melanoma Cells. *J Invest Dermatol* 2012; 132: 1877–1885.

Salvatore D, Santoro M, Schlumberger M. The importance of the RET gene in thyroid cancer and therapeutic implications. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 296–306.

Sambrook J, Russell DW, Sambrook J. The condensed protocols from *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2006; 16: 144-156.

Sanmamed MF, Perez-Gracia JL, Schalper KA, Fusco JP, Gonzalez A, Rodriguez-Ruiz ME, et al. Changes in serum interleukin-8 (IL-8) levels reflect and predict response to anti-PD-1 treatment in melanoma and non-small-cell lung cancer patients. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol* 2017; 28: 1988-1995.

Sasidharan Nair V, Toor SM, Ali BR, Elkord E. Dual inhibition of STAT1 and STAT3 activation downregulates expression of PD-L1 in human breast cancer cells. *Expert Opin Ther Targets* 2018; 22: 547–557.

Sato H, Niimi A, Yasuhara T, Permata M, Hagiwara Y, Isono M, et al. DNA double-strand break repair pathway regulates PD-L1-Expression in cancer cells. *Nat Commun* 2017; 8: 10-15.

Schlumberger M, Leboulleux S. Current practice in patients with differentiated thyroid cancer. *Nat Rev Endocrinol* 2021; 17: 176–188.

Schuster-Bruce J, Jani C, Goodall R, Kim D, Hughes W, Saliccioli JD, et al. A Comparison of the Burden of Thyroid Cancer Among the European Union 15+ Countries, 1990-2019: Estimates From the Global Burden of Disease Study. *JAMA Otolaryngol Neck Surg* 2022; 148: 350–359.

Seib CD, Sosa JA. Evolving Understanding of the Epidemiology of Thyroid Cancer. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2019; 48: 23–35.

Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, Garcia-Diaz A, Hu-Lieskovan S, Kalbasi A, et al. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations. *Cancer Discov* 2017; 7: 188–201.

Sriuranpong V, Park JI, Amornphimoltham P, Patel V, Nelkin BD, Gutkind JS. Epidermal growth factor receptor-independent constitutive activation of STAT3 in head and neck squamous cell carcinoma is mediated by the autocrine/paracrine stimulation of the interleukin 6/gp130 cytokine system. *Cancer Res* 2003; 63: 2948–2956.

Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, et al. Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res* 2003; 63: 6784–90.

Stutvoet TS, Kol A, de Vries EG, de Bruyn M, Fehrmann RS, Terwisscha van Scheltinga AG, et al. MAPK pathway activity plays a key role in PD-L1-Expression of lung adenocarcinoma cells. *J Pathol* 2019; 249: 52–64.

Sun C, Mezzadra R, Schumacher TN. Regulation and Function of the PD-L1 Checkpoint. *Immunity* 2018; 48: 434–452.

Sun L, Wang Q, Chen B, Zhao Y, Shen B, Wang H, et al. Gastric cancer mesenchymal stem cells derived IL-8 induces PD-L1-Expression in gastric cancer cells via STAT3/mTOR-c-Myc signal axis. *Cell Death Dis* 2018; 9: 1–11.

Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer* 2015; 113: 365–371.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350–4354.

Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep* 2019; 9: 4641.

Verma AK, Messerli SM, Miskimins WK. Lactate induces PD-L1 in HRASG12V-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 2020; 11: 1493–1504.

Wang Y, Wang H, Yao H, Li C, Fang J-Y, Xu J. Regulation of PD-L1: Emerging Routes for Targeting Tumor Immune Evasion. *Front Pharmacol* 2018; 9.

Weber J, Mandala M, Del Vecchio M, Gogas HJ, Arance AM, Cowey CL, et al. Adjuvant Nivolumab versus Ipilimumab in Resected Stage III or IV Melanoma. *N Engl J Med* 2017; 377: 1824–1835.

Weber JS, D'Angelo SP, Minor D, Hodi FS, Gutzmer R, Neyns B, et al. Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2015; 16: 375–384.

Weber JS, Kudchadkar RR, Yu B, Gallenstein D, Horak CE, Inzunza HD, et al. Safety, efficacy, and biomarkers of nivolumab with vaccine in ipilimumab-refractory or -naive melanoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2013; 31: 4311–4318.

Wen Z, Zhong Z, Darnell JE. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 1995; 82: 241–250.

Yabu M, Shime H, Hara H, Saito T, Matsumoto M, Seya T, et al. IL-23-dependent and -independent enhancement pathways of IL-17A production by lactic acid. *Int Immunol* 2011; 23: 29–41.

Zhang Z, Liu D, Murugan AK, Liu Z, Xing M. Histone deacetylation of NIS promoter underlies BRAF V600E-promoted NIS silencing in thyroid cancer. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21: 161–173.

Zhao K, Yang H, Kang H, Wu A. Identification of Key Genes in Thyroid Cancer Microenvironment. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2019; 25: 9602–9608.

Zhao T, Li Y, Zhang J, Zhang B. PD-L1-Expression increased by IFN- $\gamma$  via JAK2-STAT1 signaling and predicts a poor survival in colorectal cancer. *Oncol Lett* 2020; 20: 1127–1134.

## 9. Danksagung

Großer Dank gilt Prof. Dr. Essler und Prof. Dr. Dr. Bundschuh für die Möglichkeit der Promotion und die Überlassung dieses sehr spannenden Themas. Beide Professoren haben sich bemerkenswert viel Zeit für Gespräche genommen und es geschafft eine äußerst wertschätzende Arbeitsatmosphäre zu schaffen.

Dank gebührt ebenso Herrn Prof. Dr. Michael Hölzel für seine freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Zweitgutachter zu beurteilen.

In meinem Dank besonders hervorheben möchte ich die wöchentlich stattgefundenen Forschungsbesprechungen, in denen man sich in großer Runde zusammengefunden hat und sich über den aktuellen Stand seiner Arbeit ausgetauscht hat. In diesen Forschungsbesprechungen hatte man als Doktorand die Ehre von sehr forschungserfahrenen Professoren, Wissenschaftlern und Ärzten von einem konstruktiven Diskurs zu profitieren. Für mich gingen diese Forschungsbesprechungen weit über einen reinen Austausch hinaus: Sie halfen mir neue Perspektiven auf zuvor scheinbar unlösbare Probleme zu eröffnen, neue Motivation in Durstphasen zu schöpfen und den Kurs in der oft sehr stürmischen Laborphase zu halten. In dem Kontext möchte ich mich auch bei der Forschungsgruppe um Prof. Dr. Michael Muders, insbesondere bei Dr. Sarah Förster und Dr. Thomas Mayr bedanken, die immer ein offenes Ohr für uns Doktoranden aus der NUK hatten.

Ein ganz besonderer Dank gilt Nadine Veit, die mir als sehr erfahrene BTA in allen Phasen meiner Doktorarbeit eine große mentale und fachliche Unterstützung war, mir aber auch als Mensch ans Herz gewachsen ist.

Meinen Mitdoktoranden Aurelia, Janina und Katharina danke ich dafür, dass die Arbeit im Labor nie langweilig wurde.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich für das entgegengebrachte Vertrauen der AG Frede, wenn ich mal wieder einen Westernblot am Imager auswerten wollte. In diesem Zuge möchte ich mich auch bei Dr. Stephan Garbe und Dr. Thomas Müdder aus der

Medizinphysik für ihre herzliche Unterstützung bei allen Dingen rund um die Bestrahlungsversuche bedanken.

Auch Anke Carstensen dient mein Dank, die die Kooperation mit dem Zentrallabor für die Laktatkonzentrationsbestimmungen des konditionierten Mediums ermöglichte.

Mein größter Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden, die mich während des ganzen Medizinstudiums und während der Promotion fortwährend unterstützt haben.