

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
Onkologie, Hämatologie, Klinische Immunologie, Rheumatologie
und Pulmologie**

**Entwicklung, Produktion und präklinische
Charakterisierung bispezifischer NKG2D Fusionsproteine
zur Immunmodulation von NK und T Zellen zur Therapie
von malignen hämatopoetischen Neoplasien**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schumacher, Andreas

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. R. Salih

2. Berichterstatter: Professor Dr. H. Langer

Tag der Disputation: 24.07.2018

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Zusammenfassung	2
2. Einleitung	3
2.1. Das Immunsystem	3
2.2. Das adaptive Immunsystem.....	6
2.3. Tumoren und das Immunsystem.....	7
2.4. Immuntherapie.....	8
2.5. Leukämien	10
2.6. NKG2D und seine Liganden	12
2.7. Zielsetzung dieser Arbeit.....	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Material.....	15
3.2. Methoden.....	20
4. Ergebnisse	30
4.1. Charakterisierung der NKG2D-Konstrukte	30
4.2. Affinitätsvergleich von NKG2D-CD16 und NKG2D-ADCC zum Fc-Rezeptor.....	33
4.3. Zytotoxizitäts-Assays	34
5. Diskussion.....	40
6. Literaturverzeichnis.....	46
7. Anhang	55
7.1. Abkürzungsverzeichnis	55
7.2. Abbildungsverzeichnis	57
7.3. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift	58
7.4. Danksagung.....	59

1. Zusammenfassung

Die Immuntherapie hat in den letzten Jahren einen zunehmend höheren Stellenwert für die Behandlung maligner Tumoren eingenommen. Dabei konnten chimärisierte und humanisierte monoklonale Antikörper die Prognose verschiedener maligner Erkrankungen erheblich verbessern. Dennoch weisen heutige anti-Tumor-Antikörper unter anderem bezüglich ihrer immunstimulierenden Aktivität sowie der Antigenbindung Schwächen auf. Ein Ansatz zur Entwicklung neuer, effizienterer Formate ist dabei die Herstellung bispezifischer Antikörper (bsAb), die nach der Bindung an ihr Zielantigen mit ihrem Effektorarm eine gezieltere Immunaktivierung bewirken, da sie spezifische Rezeptoren aktivieren und eine definierte Population an Effektorzellen rekrutieren können. Durch bsAb kann nicht nur der aktivierende CD16 Rezeptor auf NK Zellen spezifisch aktiviert werden, sondern über Stimulation von CD3 auch eine Immunantwort zytotoxischer T Zellen mit ihrem höheren Effektorpotential induziert werden. Um klinisch relevante, effektive, zielgerichtete neuartige Antikörper zu entwickeln, ist die Identifikation möglichst tumorrestringierter Zielstrukturen von großer Bedeutung.

Gegenstand dieser Arbeit ist deshalb die Entwicklung, Herstellung und Charakterisierung neuartiger Immunrezeptor Fusionsproteine, welche mit ihrem Immunrezeptoranteil (aus der extrazellulären Domäne von NKG2D) die Zielantigene NKG2D Liganden (NKG2DL) binden. Der Effektorarm der Fusionsproteine besteht aus einem Antikörperfragment, welches entweder gegen CD16 (Aktivierung des FcγIIIa Rezeptors auf NK Zellen) oder gegen CD3 (Stimulation von T Zellen) gerichtet ist.

Nach erfolgreicher Produktion und Reinigung beider Fusionsproteine erfolgte zuerst eine Charakterisierung der neuen Proteine. So konnten für beide Konstrukte, NKG2D-CD16 und NKG2D-CD3, eine spezifische Bindung sowohl an die Effektor-Seite sowie an die Ziel-Seite nachgewiesen werden. Für NKG2D-CD16 zeigte sich im Vergleich zu einem bereits in Vorarbeiten entwickelten, monospezifischen Fusionsprotein NKG2D-Fc-ADCC in Titrationsexperimenten eine erhöhte Affinität gegenüber dem Fc-Rezeptor auf NK Zellen.¹ Auch die spezifische Bindung der Konstrukte an ihre jeweilige Effektorpopulation konnte gezeigt werden. In *Zytotoxic-Assays* wurde für beide Konstrukte die gezielte Lysierung der Zielzellen nachgewiesen. Erste funktionelle Daten belegen somit das Anti-Tumor-Potential der beiden Fusionsproteine, welche ein vielversprechendes Therapeutikum für die Immuntherapie darstellen können.

2. Einleitung

2.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein Abwehrsystem höherer Lebewesen und schützt diese vor schädlichen endogenen und exogenen Reizen. Exogene Reize durch Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten müssen durch das Immunsystem dabei genauso erkannt werden, wie endogene Reize durch apoptotische, körpereigene Zellen oder Nekrosen. Hierfür muss man zunächst die beiden Hauptkomponenten des Immunsystems, das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem voneinander abgrenzen. Beide Systeme bestehen jeweils aus zellulären und humoralen Komponenten. Zelluläre Repräsentanten, unter dem Begriff Leukozyten zusammengefasst, stammen alle von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen ab und lassen sich nach verschiedenen Differenzierungsschritten der myeloischen und der lymphatischen Reihe zuordnen. In Abbildung 1 sind die einzelnen Komponenten des Immunsystems systematisch aufgelistet.

	Zelluläre Komponenten	Humorale Komponenten
Angeborenes Immunsystem	Granulozyten Monozyten/Makrophagen Dendritische Zellen NK Zellen	Komplementfaktoren Lysozym Zytokine
Adaptives Immunsystem	B Zellen T Zellen	Antikörper

Abbildung 1: Die Komponenten des Immunsystems.

2.1.1. Das angeborene Immunsystem

Der basale Schutzmechanismus des Immunsystems ist die angeborene Immunität. Sie ist das „schnelle und unspezifische“ Abwehrsystem, das bereits in den ersten Stunden einer akuten Infektion aktiv wird. Zelluläre Repräsentanten sind hier neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen, dendritische Zellen (DCs) sowie NK Zellen. Der humorale Anteil wird hauptsächlich durch Zytokine sowie das Komplementsystem vermittelt, welches sowohl C3/C5-vermittelte Lyse induziert als auch fremdes Zellmaterial opsonisiert.^{2,3} Die Erkennung veränderter oder fremder Zellen findet zum größten Teil über *pathogene-associated molecular patterns* (PAMPs) statt, die sich auf der Oberfläche von vielen nicht-körper-eigenen Zellen und Organismen, vor allem auf Bakterien befinden, oder über strukturell nicht-körper-eigene Nucleinsäuren (virale doppelsträngige RNA).^{4,5} Diese Merkmale werden durch *pattern-recognition-receptors* (PRRs), wie beispielsweise die *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), auf der Oberfläche der Effektorzellen der angeborenen Immunabwehr erkannt.⁶ Dies führt zu einer Aktivierung der Effektorzellen, die wiederum eine Entzündungsreaktion auslösen und unter anderem durch vermehrte Durchblutung und Aktivierung des Endothels weitere Abwehrzellen anlocken.⁷ DCs übernehmen hierbei wesentlich die Vermittlung zwischen der angeborenen und der erworbenen Immunantwort. Dabei prozessieren sie Antigene des Pathogens und präsentieren diese zusammen mit kostimulatorischen Molekülen auf ihrer Oberfläche den Zellen des erworbenen Immunsystems.

2.1.1.1. NK Zellen als Teil der angeborenen Immunabwehr

Zum angeborenen Immunsystem gehören wie bereits erwähnt die 1975 entdeckten NK Zellen, welche zu den Lymphozyten mit zytotoxischer Aktivität zählen.^{8,9} Sie induzieren die Lyse von veränderten und erkrankten Zellen durch zytotoxische Granula⁹⁻¹³ sowie durch Apoptose.¹⁴⁻¹⁷ Im peripheren Blut liegt ihr Anteil an allen mononukleären Zellen bei 5 bis 10 Prozent. Außerdem kommen sie vermehrt in Milz und Knochenmark vor.^{18,19} NK Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Früh-Reaktion des Immunsystems auf bakterielle oder virale Infektionen.²⁰⁻²² Darüber hinaus erfüllen sie weitere wichtige Aufgaben wie die Produktion von Interferon γ (IFN- γ), ein Zytokin aus der Familie der Interferone. Sie aktivieren hierüber Makrophagen^{11,23-25}, führen zur Proliferationshemmung und Apoptoseinduktion von veränderten körpereigenen Zellen und aktivieren das adaptive Immunsystem.²⁵ Ihre Rolle bei der Immunkontrolle von Tumoren und Metastasen menschlicher als auch muriner Zellen ist bisher vielfach belegt.^{24,26-33}

Ihre Identifikation mittels Durchflusszytometer ist durch das von ihnen auf der Oberfläche exprimierte CD56-Molekül, sowie das Fehlen von CD3 möglich. Wenn also im Folgenden von CD56⁺CD3⁻-Zellen die Rede ist, sind damit immer NK Zellen gemeint.²⁰

NK Zellen sind eine wichtige Komponente des Immunsystems. Sie spielen bei der Verhinderung der Entstehung sowie für die Kontrolle und Bekämpfung von Tumoren eine entscheidende Rolle. Daher wird im Folgenden auf die Molekülsysteme eingegangen, die die NK-Zell-Reaktivität regulieren.

2.1.1.2. NK-Zell-Reaktivität

Die Reaktivität von NK Zellen ist durch ein sensibles Gleichgewicht verschiedener aktivierender und inhibierender Rezeptoren gesteuert.²³ Damit nicht willkürlich körpereigene (gesunde und transformierte) als auch körperfremde Zellen erkannt und lysiert werden, müssen NK Zellen zunächst feststellen, ob es sich um körpereigene oder fremde Zellen handelt. Die sogenannte „*missing self*“-Hypothese von Klas Kärre (1985) besagt, dass NK Zellen über die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen (*major histocompatibility complex*, MHC-I) auf der Oberfläche von körpereigenen Zellen diese als solche erkennen und über inhibitorische Rezeptoren in ihrer Aktivität gehemmt werden. Die verminderte oder fehlende Expression von MHC-I auf infizierten körpereigenen oder Tumorzellen führt somit zu einem Mangel an Inhibition und damit zur Aktivierung der NK Zellen.^{34,35}

Da allerdings nicht alle Zellen des Körpers MHC-I exprimieren, wie beispielsweise Erythrozyten, und dennoch nicht von NK Zellen lysiert werden, wurde später in der „*induced self*“-Hypothese postuliert, dass die Erkennung von transformierten oder infizierten Zellen zudem über Stress-induzierte Rezeptorsignale reguliert wird. Nach dieser bis heute gültigen Hypothese exprimieren durch Transformation oder Infektion gestresste Zellen Liganden, die durch auf NK Zellen exprimierte, aktivierende Rezeptoren erkannt werden.³⁶⁻³⁸ Für die Aktivierung von NK Zellen reicht also nicht nur der Wegfall von inhibierenden Signalen, vielmehr sind auch aktivierende Signale notwendig.¹⁹ Mitentscheidend für die Aktivierung der NK Zellen sind vor allem die sogenannten Fc-Rezeptoren, auf die im nächsten Abschnitt eingegangen werden soll, sowie der aktivierende NKG2D-Rezeptor, auf den später gesondert eingegangen wird.

2.1.2. Fc-Rezeptor

NK Zellen exprimieren wie fast alle hämatopoetischen Zellen sogenannte Fc-Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Es gibt viele Untergruppen des Fc-Rezeptors. Zur Auslösung einer Immunreaktion kommt allerdings der Interaktion zwischen dem IgG-Fc-Teil eines monoklonalen Antikörpers (mAb) und dem IgG-spezifischen Fc-Rezeptor ($Fc\gamma R$) auf der Effektorzelle die größte Bedeutung zu. Daher wird im Folgenden besonders auf die $Fc\gamma R$ eingegangen. Sie bestehen aus drei aktivierenden ($Fc\gamma RI$, $Fc\gamma RIIA$, $Fc\gamma RIII$) sowie einem inhibierenden ($Fc\gamma RIIB$) Molekül. NK Zellen exprimieren nur den äußerst potent aktivierenden $Fc\gamma RIIIA$ (CD16) und sind somit hauptverantwortlich für die Antikörper-vermittelte Lysierung von entarteten und infizierten Zellen (*antibody-dependent cellular cytotoxicity*, ADCC). Binden Immunkomplexe an den $Fc\gamma RIIIA$ -Rezeptor, so schüttet die NK Zelle Perforine und Granzyme aus, die zur Lyse der Zielzelle führen.^{39,40}

2.2. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem stellt die zweite „Welle“ der Immunantwort dar und reagiert spezifisch auf Pathogene. Zellulär wird das adaptive Immunsystem repräsentiert von B- und T-Lymphozyten.

Der wesentlich höheren Effektivität des adaptiven gegenüber dem angeborenen Immunsystems liegen spezifische B- und T-Zell-Rezeptoren (BZR/TZR) zugrunde, die durch somatische Rekombination und Hypermutation hochspezifisch auf ein Antigen reagieren. Dabei sind die T Zellen hauptverantwortlich für die zelluläre Immunantwort, wohingegen die B Zellen (später Plasmazellen) durch die Produktion von Antikörpern vor allem die humorale Antwort der adaptiven Abwehr induzieren. Sowohl B Zell-Rezeptoren bzw. die B Zell-Antikörper als auch die T Zell-Rezeptoren(TZR) sind Teil der Immunglobulin-Superfamilie.⁴¹⁻⁴³ Für den Großteil aller T Zellen ist er aus den beiden Polypeptidketten α und β zusammengesetzt, die über Disulfid-Bindungen miteinander verknüpft sind.^{44,45} Der TZR gleicht vom Aufbau her einem Fab-Immunglobulin-Fragment. Er besitzt, wie auch die Immunglobuline, eine variable (V) sowie eine konstante Domäne (K). Seine Spezifität wird durch die sogenannte somatische Rekombination, eine zufällige Rekombination verschiedener Genabschnitte, bestimmt.⁴⁶ Ein elementarer Co-Rezeptor des TZR ist der CD3-Rezeptor. Er besteht aus vier Polypeptidketten ($\gamma, \delta, \epsilon, \epsilon$) und ist in Kombination mit dem TZR für die Aktivierung der T Zelle verantwortlich. Erst nach dem Kontakt der T Zelle mit dem auf den TZR passenden, spezifischen Epitop eines mit einem Antigenpeptid beladenen MHC-Moleküls einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ), sowie weiteren Kostimuli, wird die T Zelle aktiviert

und reift zu einer Effektorzelle.⁴⁷ Aufgrund der unterschiedlichen Oberflächenmarker und Effektorfunktionen unterscheidet man hier zwei Hauptpopulationen von CD3⁺ T Zellen anhand deren Korezeptoren: CD4⁺ T Zellen und CD8⁺ T Zellen.⁴⁸ CD4⁺ T Zellen können über Antigenpeptide auf MHC-II von APZ aktiviert werden und reifen zu sogenannten T Helferzellen. Ihre primäre Aufgabe ist die Ausschüttung von Zytokinen, wodurch sie eine Steuerfunktion für die Immunantwort übernehmen. CD8⁺ T Zellen enthalten zytotoxische Granula und erkennen virusinfizierte oder entartete, Antikörper-gebundene Zellen und töten diese ab.⁴⁹⁻⁵¹

Das adaptive Immunsystem besitzt außerdem die Fähigkeit, ein sogenanntes immunologisches Gedächtnis zu bilden. So kann eine erneute Infektion mit dem gleichen Pathogen verhindert werden. Neben der Abwehr von bakteriellen, viralen und parasitären Infektionen nimmt das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Bekämpfung von Tumoren ein.

2.3. Tumoren und das Immunsystem

Tumoren sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zur Therapie von Tumoren standen bisher meist nur die Chirurgie sowie die Chemo- und Strahlen-Therapie zur Verfügung. Die Erfolge dieser Therapien konnten in den letzten Jahren für viele maligne Erkrankungen verbessert werden. Dennoch gibt es weiterhin zahlreiche Patienten, die nicht ausreichend effektiv bzw. kurativ behandelt werden können. Der Grundstein für einen weiteren Ansatz, die Immuntherapie, wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts von Paul Ehrlich gelegt und konnte 1967 von Frank Burnet erstmals nachgewiesen werden. Er konnte zeigen, dass das Immunsystem in der Lage ist, Tumorzellen zu identifizieren und zu eliminieren. Dieses Prinzip, bekannt als Immunüberwachung (*immune surveillance*), hat bis heute Gültigkeit. Kommt es allerdings zum Versagen der Immunüberwachung bzw. ihrer molekularen Steuerung, können Tumoren auftreten.⁵² Umgekehrt bedeutet dies, dass es Tumoren gibt, die diese Immunüberwachung umgehen können. Dieses Verhalten wird als „*immune escape*“ bezeichnet. Abhängig von ihrem Potential, das Immunsystem zu umgehen, können Tumorzellen sich somit vermehren und Absiedlungen, sogenannte Metastasen, bilden. Bis heute werden verschiedene Mechanismen des *immune escape* diskutiert. Hierbei könnte zum Beispiel die sog. Herunterregulation von MHC-I-Oberflächenmolekülen eine entscheidende Rolle spielen.⁵³⁻⁵⁶

2.4. Immuntherapie

Die Immuntherapie ist ein weites Feld und wird aktuell in verschiedenste Richtungen erforscht. Neben dem Einsatz von Antikörpern besteht die Immuntherapie ebenfalls beispielsweise aus der Zelltransplantation, der Entwicklung immunmodulatorischer Moleküle, sowie der Vakzinierung. Ihr Ziel ist es, dem körpereigenen Immunsystem die Erkennung und Eliminierung veränderter, maligner Zellen ganz spezifisch zu ermöglichen und so selbst sogenannte Tumor-*escape*-Mechanismen zu durchbrechen. Mit dem Ziel, nur maligne und entartete Zellen anzugreifen, hat die Immuntherapie gegenüber den konventionellen Therapien (Chemo- und Radiotherapie) den großen Vorteil, gesundes Gewebe nicht zu schädigen. Relevant im Sinne der Therapie von Leukämien ist unter immunologischen Aspekten vor allem die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen. Dabei wird zunächst das patienteneigene hämatopoetische System mittels Hochdosis-Chemotherapie zerstört, um es im Anschluss durch die Transplantation neuer Stammzellen zu rekonstituieren. Durch die im Transplantat enthaltenen aktiven Immunzellen kommt es dann zu einer erwünschten sogenannten *graft-versus-leukemia*-Reaktion (GvL). Dabei werden die entarteten, malignen Zellen des Patienten erkannt und eliminiert. Da bei der allogenen Stammzelltransplantation die Zellen von einem fremden Spender transplantiert werden, kann es dazu kommen, dass auch gesunde körpereigene Zellen des Empfängers von den Lymphozyten als „fremd“ erkannt und eliminiert werden. Diese Reaktion wird „Transplantat-gegen-Wirt-Krankheit“ (*graft-versus-host-disease*, GvHD) genannt und ist bedingt durch die HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger. Um das Fehlen von reifen Lymphozyten direkt nach der Transplantation zu überbrücken, wird häufig eine Spenderlymphozytentransfusion (*donor lymphocyte infusion*, DLI) durchgeführt, bei der es ebenfalls zur erwünschten GvL-Reaktion kommen kann.⁵⁷

Eine andere Strategie der Immuntherapie ist die Generierung von therapeutischen anti-Tumor-Antikörpern. Dabei wird versucht, möglichst Tumor-restringierte Antigene für die Antikörpertherapie zu identifizieren. Therapeutische Antikörper sind heute bereits vielfach zur Therapie maligner Erkrankungen zugelassen und konnten die Prognose einzelner Tumorerkrankungen deutlich verbessern. Beispielsweise ist mit Rituximab, einem monoklonalen anti-Tumor-Antikörper, in den letzten Jahren ein durchschlagender therapeutischer Erfolg in der Behandlung des B-Zelllymphoms auf ADCC-Basis gelungen, der die Grundlage für weitere Forschung auf diesem Gebiet bildet.⁵⁸

2.4.1. Antikörpertherapie

Biochemisch gesehen sind Antikörper Glykoproteine aus vier Polypeptidketten. Durch zwei identische schwere Ketten (50 kDa), sowie zwei identische leichte Ketten (25 kDa) entsteht die bekannte Y-Struktur. Die schweren Ketten eines Ig γ -Antikörpers bestehen jeweils aus einer N-terminalen variablen (V_H) sowie drei konstanten Domänen (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3}). Die leichten Ketten besitzen ebenfalls eine N-terminale Variable (V_L), allerdings nur eine konstante Domäne (C_L).⁵⁹ Die schweren Ketten legen den Isotyp des Immunglobulins fest. Im Blut kommen vor allem IgG- und IgM-Moleküle vor. IgG-Antikörper können aufgrund ihrer geringen molekularen Größe Blutgefäße penetrieren und haben verglichen mit den anderen Immunglobulinen eine verlängerte Serumhalbwertszeit. Daher eignen sich Immunglobuline vom Typ IgG besonders zur Produktion von therapeutischen Antikörpern. Antikörper lassen sich in zwei antigenbindende Fragmente (*fragment antigen binding*, Fab), sowie ein Fc-Fragment (*fragment crystallizable*, Fc) unterteilen. Die antigenbindenden Fragmente sind identisch und bedingen über ihre hypervariablen Domänen die Antigenspezifität. Das konstante Fc-Fragment vermittelt über Bindung an den Fc-Rezeptor einer Effektorzelle oder beispielsweise an den Komplementfaktor C1q die immunogene Wirkung. Diese Wirkung auf die Effektoren des Immunsystems wird auch als indirekte Wirkung bezeichnet. Im Gegensatz dazu bezeichnet die direkte Wirkung die Bindung der Fab-Fragmente an Oberflächenrezeptoren auf der Zielzelle und die damit blockierte Rezeptor-Liganden-Interaktion durch neutralisierende oder antagonistische Antikörper, oder aber zum Beispiel die Apoptose-Induktion durch Bindung von agonistischen Antikörpern auf Apoptose-Rezeptoren.

Heute spielen monoklonale Antikörper in der Therapie von malignen Erkrankungen eine wichtige Rolle. Viele der heute zur Immuntherapie zugelassenen Antikörper zählen zur sogenannten zweiten Generation und vermitteln vor allem über den Fc-Rezeptor eine immunologische Wirkung. Um die Effektorfunktion weiter zu verbessern, werden verschiedene Ansätze verfolgt. Ebenso wird an der Generierung Fc-optimierter Antikörper gearbeitet. Dabei wird eine Affinitätssteigerung des Fc-Fragments zum Fc-Rezeptor entweder über die Modifizierung der Glykosylierung des Fc-Teils⁶⁰ oder aber über eine bestimmte Mutation in der Aminosäuresequenz der IgG-Moleküle (SDIE-Modifikation) und somit eine verstärkte ADCC-Effektorfunktion erreicht.⁶¹⁻⁶⁴

Ein Problem bei dem Einsatz von monoklonalen (auch Fc-optimierten) Antikörpern ist, dass deren Fc-Teile auch an FcR binden können, welche eine inhibierende Wirkung auf die Immunantwort haben (z.B. Fc γ IIb1, Fc γ IIb2). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Interaktion von Antikörpern oder Fusionsproteinen mittels ihrer Fc-Teile mit dem FcR durch Komponenten des Komplementsystems beeinträchtigt wird und von FcR Polymorphismen wie

V158F in Fc γ R111A abhängig ist. Eine Möglichkeit, diese unerwünschten Interaktionen zu umgehen, ist die Entwicklung sogenannter bispezifischer Antikörper oder Fusionsproteine.

2.4.2. Bispezifische Fusionsproteine

Bispezifische Antikörper oder Fusionsproteine bestehen jeweils aus einem Zielarm, der sich gegen ein auf Tumorzellen exprimiertes Zielantigen richtet, und einem Effektorarm, der idealerweise ausschließlich nach Bindung des Zielarms, d.h. zielantigenrestringiert, einen immunaktivierenden Rezeptor stimuliert. Der Vorteil dieses Konzepts liegt darin, dass bispezifische Formate eine gezieltere Immunaktivierung als mAb erlauben, da sie spezifische Rezeptoren aktivieren und somit eine definierte Population an Effektorzellen rekrutieren können. So kann neben der spezifischen Aktivierung des CD16 Rezeptors auch die Stimulation von CD3 als Effektorantigen angesteuert werden, was eine von zytotoxischen T Zellen vermittelte Immunantwort ermöglicht, welche im Vergleich zu NK Zellen ein höheres Effektorpotential besitzen.

Mit Blinatumomab (Blincyto[®]), einem CD19xCD3 BiTE Antikörper, wurde im November 2015 erstmals ein prototypischer bispezifischer Antikörper zur Rekrutierung von T Zellen für die Therapie der akuten lymphatischen Leukämie in Europa zugelassen.⁶⁵

2.5. Leukämien

Als Leukämie bezeichnet man maligne Neoplasien des myeloepoetischen oder des lymphatischen Systems. Im System der Myeloepoese unterscheidet man dabei zwischen der akuten myeloischen und der chronisch myeloischen Leukämie. Die akute myeloische Leukämie (AML) entsteht in einem mehrstufigen Prozess, dessen Grundlage die monoklonale Proliferation einer kleinen Population von transformierten leukämischen Stammzellen bildet. Durch die unkontrollierte Proliferation kommt es zu einer Akkumulation der unreifen leukämischen Blasten im Knochenmark. Diese verdrängen die Zellen der normalen Hämatopoese und führen zu einer Knochenmarksinsuffizienz.⁶⁶

2.5.1. Die akute myeloische Leukämie

Die AML ist vor allem eine Erkrankung des älteren Menschen. Etwa 80% der akuten Leukämien bei Erwachsenen sind myelischer Genese. Bei Kindern ist die AML seltener und wird in etwa 15-20% der kindlichen akuten Leukämien diagnostiziert. Man unterscheidet bei der AML Formen ohne chromosomale Aberrationen von Formen mit Chromosomenaberration. Für die Diagnose einer AML nach WHO-Klassifikation gibt es daher zwei Wege: Wenn der Anteil leukämischer Blasten im Knochenmark oder peripheren Blut bei über 20% liegt, muss eine AML diagnostiziert werden. Unabhängig von der Anzahl der Blasten kann diese Diagnose ebenfalls gestellt werden, wenn eine bereits bekannte chromosomale Aberration molekular- und zytogenetisch nachgewiesen werden kann.⁶⁷ Die Einteilung der AML erfolgt heute nach der WHO-Klassifikation anhand der folgenden Abbildung.

Kategorie	Leukämieform
1. AML mit typischen zytogenetischen Veränderungen	AML mit t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1 AML mit inv(16)(p13.1;q22) oder t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11 APL mit t(15;17)(q22;q12); PML-RARA AML mit t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL AML mit t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214 AML mit inv(3)(q21;q26.2) oder t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 AML (megakaryoblastisch) mit t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1 AML mit NPM1-Mutation AML mit CEBPA-Mutation
2. AML mit Myelodysplasie-assoziierten Veränderungen	definiert durch: Zytogenetik MDS Vorphase Morphologie
3. Therapie-assoziierte myeloische Neoplasien	
4. AML, nicht anderweitig klassifiziert	AML mit minimaler Differenzierung AML ohne Ausreifung AML mit Ausreifung Akute myelomonozytäre Leukämie Akute monozytäre Leukämie Akute Erythrozytenleukämie Akute Megakaryoblastenleukämie Akute Basophilenleukämie Akute Panmyelose mit Myelofibrose

Abbildung 2: WHO-Klassifikation der AML.⁶⁸

2.5.2. Therapie der AML

Die heutige Therapie der AML lässt sich unterteilen in Induktions- und Postremissionstherapie. Die Induktionstherapie erfolgt zum Beispiel mit Cytarabin und Daunorubicin bzw. Idarubicin im sog. 3+7-Schema. Ziel der Induktionstherapie ist die Komplettremission, was die Normalisierung des Blutbildes, sowie die Reduktion der leukämischen Blasten im Knochenmark auf unter 5 Prozent bedeutet. Die Induktionstherapie sollte sofort nach Diagnosestellung eingeleitet werden, da schon eine Verzögerung um wenige Tage bei jungen Patienten eine Prognoseverschlechterung bedingt.^{69,70,71}

In der Postremissionsphase ist das Ziel, ein Rezidiv der AML zu verhindern. Dazu gibt es in der Konsolidierungstherapie, abhängig vom Risikoprofil und Allgemeinzustand des Patienten, seines Alters und der genetischen Subgruppe der AML verschiedene Empfehlungen.⁷² In Frage kommen hier einerseits die allogene Transplantation hämatopoetischer Stammzellen, alternativ 3 bis 4 Zyklen Cytarabin (Ara-C). Die sogenannte Erhaltungstherapie erfolgt vor allem im Rahmen von Studien und nach unterschiedlichen Protokollen. Aufgrund der hohen Rezidiv-Raten bei Patienten nach Chemotherapie und um die hohen Risiken einer Stammzelltransplantation zu vermeiden, kommt der Erforschung der Immuntherapien der AML eine besondere Bedeutung zu. Entscheidend dafür ist unter anderem die Identifizierung neuer, Tumor-restringierter Antigene.

2.6. NKG2D und seine Liganden

Von den aktivierenden Rezeptoren auf der Oberfläche der NK Zellen, ist der NKG2D-Rezeptor (*natural killer group 2 member D*) besonders gut charakterisiert. NKG2D ist ein Typ II Transmembranprotein, welches im Menschen auf dem Chromosom 12 kodiert ist. Es enthält eine extrazelluläre, dem C-Typ-Lektin ähnliche Domäne und bildet im Unterschied zu anderen Familienmitgliedern ein Homodimer.⁷³ Es ist bekannt, dass der NKG2D-Rezeptor auf NK Zellen, NKT Zellen, zytotoxischen T Zellen und gamma-delta T Zellen exprimiert wird. Seine Funktionen unterscheiden sich entsprechend der Zellart auf der er als direkt aktivierendes oder kostimulatorisches Molekül exprimiert wird. Der NKG2D-Rezeptor der T Zellen hat eher kostimulatorische Bedeutung, während er NK Zellen direkt aktivieren kann. So kann er auf NK Zellen selbst bei Vorliegen eines inhibierenden Stimulus zur Aktivierung führen.^{36,73-77} Die Expression von NKG2D wird streng reguliert und kann durch die IL-2, IL-15, TNF und IFN γ hoch- bzw. durch TGF β , IFN γ und IL-21 herunterreguliert werden.^{23,78-80}

Aufgrund des hohen Aktivierungspotentials des NKG2D-Rezeptors ist auch die Expression von NKG2D-Liganden (NKG2DL) im Körper streng reguliert.⁷³ Die Expression dieser Liganden

wird vor allem durch maligne Transformation, Hitzeschock oder Infektionen und damit bedingtem zellulären Stress induziert.⁸¹⁻⁸⁶ Prinzipiell muss man zwei Gruppen an NKG2DL voneinander unterscheiden. Zum einen die MIC (*MHC class I related chain*)-Moleküle und zum anderen die RAET1 („*Retinoic acid early inducible Transcript 1*)-Moleküle (Synonym und im Folgenden auch ULBP-Proteine (*UL16-binding-proteins*) genannt). Die Expression der MIC-Moleküle MICA und MICB wird vor allem durch zellulären Stress induziert. Anders als MHC-I-Moleküle präsentieren sie jedoch keine Peptide.⁸² Die ULBP-Moleküle 1 bis 6 tragen ebenfalls eine MHC-I-ähnliche Bindungsdomäne, die für die Bindung an NKG2D verantwortlich ist.^{23,87-89} Alle Liganden haben jedoch unterschiedliche Bindungsaffinitäten an den NKG2D-Rezeptor.^{73,81,90}

Es ist bekannt, dass NKG2DL von vielen soliden und hämatopoetischen Tumoren sowie von virusinfizierten Zellen exprimiert werden.^{1,74,81-83,91-93} Allerdings konnten NKG2DL auch auf gesundem humanen Gewebe nachgewiesen werden. So werden sie zum Beispiel von einem Teil der gastrointestinalen Epithelzellen^{82,84} exprimiert bzw. intrazellulär auch von bronchialem Epithel⁹⁴, jedoch in geringem Ausmaß. Somit konnte bisher keine gesteigerte NK Zell-Reaktivität durch diese Expression nachgewiesen werden.^{82,95}

Im Sinne einer Autoregulation der immunologischen Aktivität⁹⁶ können NKG2D-Liganden auch auf dendritischen Zellen (DCs), Monozyten bzw. Makrophagen⁹⁷⁻¹⁰¹, sowie auf aktivierten T Helfer-Zellen und zytotoxischen T Zellen exprimiert werden.¹⁰²⁻¹⁰⁵ Somit kommt es beispielsweise zur Aktivierung von NK Zellen, die dann die aktivierten T Zellen lysieren und somit die T Zell-Antwort regulieren bzw. terminieren.¹⁰⁶

Die Rolle des NKG2D-Rezeptor-Liganden-Systems bei der Immunüberwachung von Tumoren ist vielfach untersucht und dennoch nicht abschließend verstanden. Das Fehlen von NKG2D in NKG2D-defizienten Mäusen geht mit einer erhöhten Inzidenz von epithelialen und lymphoiden Tumoren einher, auch wenn die Entwicklung der NK Zellen unabhängig von NKG2D stattfindet.^{107,108} Das NKG2D-Molekülsystem spielt also eine entscheidende Rolle bei der Immunüberwachung der Entstehung von Tumoren. Die Expression von NKG2D-Liganden auf ihrer Oberfläche und die dadurch ausgelöste hochpotente Aktivierung der NK Zellen üben auf die Tumorzellen einen Selektionsdruck aus. In diesem System haben Tumorzellen, die einen sogenannten *immune escape*-Mechanismus entwickelt haben, einen Vorteil. Häufig spielt für diesen *immune escape* die Freisetzung der Tumor-assoziierten Oberflächenmoleküle eine entscheidende Rolle.^{109,110}

Bisher sind vier grundlegende Mechanismen bekannt, durch die NKG2D-Liganden von der Oberfläche der Tumorzellen losgelöst werden können. Dazu gehören das proteolytische

Shedding, „*Phosphatidylinositol-specific phospholipase C*“-vermittelte Cleavage, alternatives Splicing und die Exozytose von Vesikeln.^{104,109-119} Diese *escape*-Mechanismen konnten sowohl für MIC-Proteine^{109,110} als auch für ULBP in soliden Tumoren^{81,120} und ebenfalls in hämatopoetischen Entitäten^{92,113,121-125} nachgewiesen werden. Durch diesen Mechanismus der löslichen Freisetzung sind zwei mögliche Vorteile zu diskutieren. Unumstritten ist die dadurch verminderte Dichte von NKG2D-Liganden auf der Oberfläche der Tumorzellen und die damit verbundene geringere Aktivierung von Immunzellen, die zum *immune escape* führt. Weiterhin wird diskutiert, ob die gelösten, im Blut frei zirkulierenden Liganden, für eine Herunterregulation der NKG2D-Rezeptor-Dichte auf den Immunzellen verantwortlich sind und damit auch eine reduzierte Zytotoxizität der Effektorzellen verursachen.^{75,79,81,109,126-132}

Die immense Bedeutung der NKG2D-NKG2DL-Interaktion bei der Immunüberwachung vor allem von soliden Tumoren, ist in den letzten Jahren vielfach nachgewiesen worden. Darüber hinaus konnte die Rolle der NKG2DL-Expression auf hämatopoetischen Tumoren belegt werden.⁹¹ 2012 wurde bestätigt, dass etwa 70% aller AML-Patienten einen oder mehrere NKG2D-Liganden exprimieren.¹³³ Die überwiegend Tumor-restringierte Expression von NKG2DL eignet sich deshalb für die gezielte Immuntherapie mit bispezifischen Antikörpern.

2.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung und präklinische Charakterisierung zweier Fusionsproteine zur Therapie der akuten myeloischen Leukämie. Basierend auf der Identifikation eines möglichst Tumor-restringierten Antigens auf der Oberfläche von malignen entarteten myeloischen Zellen sowie der effektiven Lyse durch ADCC-optimierte Antikörper, soll mit den neu generierten Fusionsproteinen eine noch effektivere Lyse erreicht werden. In Vorarbeiten wurden monospezifische Fc-optimierte Immunrezeptor-Ig Fusionsproteine (NKG2D-ADCC) zur Induktion von ADCC durch NK Zellen generiert. Hierbei war es wichtig, sicherzustellen, dass die durch die Fc-Modifikation verstärkt erfolgende CD16-Stimulation, den durch Bindung der Konstrukte bedingten Verlust NK-aktivierender Signale durch membranständige NKG2DL, übertrifft.^{1,134} Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden nun bispezifische CD16 und CD3 Fusionsproteine generiert und funktionell charakterisiert. Wie die Fc-optimierten Konstrukte, bestehen diese aus den extrazellulären Domänen von NKG2D, beinhalten jedoch nun Antikörperfragmente, welche sich gegen CD16 bzw. gegen CD3 richten. Hierbei wurde die extrazelluläre Domäne des Typ-II Transmembranproteins NKG2D mittels eines CH2-Linkers C-terminal an ein CD3 (NKG2D-CD3) bzw. CD16 (NKG2D-CD16) spezifisches Fab-Fragment fusioniert.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Geräte

Brutschrank Heraecell	Heraeus, Hanau, Deutschland
Chromatographie-Säule Protein A	GE Healthcare, München Deutschland
Durchlichtmikroskop, Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
ELISA-Reader, E-max	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
FACS BD FACS Canto II	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS Cytomics FC500	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
Feinwaage, Mettler AT 261 Delta	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Multilabel Counter Victor 1420	Perkin Elmer Wallac, Turku, Finnland
Multistepper	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop™1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
pH-Meter	Mettler-Toledo, Greifensee, Schweiz
Pipetteboy comfort	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland
Pipetten und Multikanalpipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vortexer	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Köttermann, München, Deutschland
Zentrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

3.1.2. Verbrauchsmaterial

Bechergläser	Schott, Mainz, Deutschland
Combi-Tips	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Cryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland Nunc, Roskilde, Dänemark
Dialyseschläuche Visking (12-14 kDa)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Einmalpipetten	Corning Inc., Corning NY, USA
Einmalspritzen	Braun, Wertheim, Deutschland
Elektroporationsküvetten	PEQLAB, Erlangen, Deutschland
FACS-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
ELISA-Platten (96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA NUNC, Roskilde, Dänemark
FACS-Platten (96 well)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Pipettenspitzen	VWR, Darmstadt, Deutschland
Reaktionsgefäße (0,5; 1,5; 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transwell Platten und Einsätze	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Vakuum-Filtrationssystem (steril)	Millipore, Billerica, MA, USA
Zellkulturflaschen	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (6, 12, 24, 48, 96 well)	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA Corning Inc. Corning, NY, USA
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Becton Dickinsons, Franklin Lakes, NJ, USA Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

7-Aminoactinomycin (7-AAD Viability staining solution)	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Agarose	Lonza, Rockland, ME, USA
Ampicillin	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
BATDA reagent	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Bovines Serum Albumin BSA	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Carbonat-Bicarbonat-Puffer	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
CountBright absolute counting beads	Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
EDTA Solution	Cambrex, Rockland, ME, USA
Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Europium Solution	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
FACS Clean, FACS Flow, FACS Rinse	BD, Heidelberg, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ficoll-Lösung	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Geneticin (G418)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Lonza, Verviers, Belgien
Medium IMDM	Lonza, Verviers, Belgien
Medium RPMI	Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Natrium Pyruvat Solution	Lonza, Verviers, Belgien
NEAA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Penicillin/Streptomycin (Pen-Strep)	Lonza, Verviers, Belgien
PBS	PAA, Pasching, Österreich
Phosphorsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
TMB MicroWell Peroxidase Substrate	KPL, Gaithersburg, MD, USA
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-114	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trypan Blue Stain 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA Solution	Lonza, Verviers, Belgien
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Nicht aufgelistete Chemikalien wurden entweder von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen.

3.1.4. Antikörper und Zytokine

Donkey-anti-human-PE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Goat-anti-mouse-PE	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Goat-anti-mouse-IgM-HRP	SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA
Humanes IgG (hIgG)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Mouse-anti-human-IgG1-PE	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Mouse IgG1	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Mouse IgG2b	Immunotools, Friesoythe, Deutschland
Mouse IgM	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
Poly-HRP-Streptavidin	Fitzgerald Industries Int., Acton, MA, USA

Nicht aufgelistete, direkt-markierte FACS-Antikörper und entsprechende Isotyp-Kontrollen wurden entweder bei BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) oder BioLegend (San Diego, CA, USA) erworben.

3.1.5. Zelllinien

AMO-1	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
P815	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan
P815-RANKL	Prof. M. Azuma, Universität Tokio, Japan
SP 2/0-Ag14	Prof. G. Jung, Universität Tübingen

3.1.6. Medien, Puffer und Lösungen

ELISA-Waschpuffer	PBS 0,5% Tween 20
FACS-Puffer	PBS 1% FCS 0,01% NaN ₃
Medium zum Einfrieren	RPMI 1640 20% FCS (hitzeinaktiviert) 10% DMSO
IMDM-Zellkulturmedium	RPMI 1640 10% FCS 1% PenStrep

IMDM-Komplettmedium	IMDM 10% FCS (hitzeinaktiviert) 1% PenStrep 1% NEAA 1% Na-Pyruvat
RPMI-Zellkulturmedium	RPMI1640 10% FCS 1% PenStrep
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris-HCl pH 8,0 5,75% (v/v) Essigsäure 50 mM EDTA

3.2. Methoden

3.2.1. Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1. Generierung von NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 Fusionsproteinen

Die Generierung der Fusionsproteine erfolgte mit großer Unterstützung von Dr. Ludger Grosse-Hovest sowie Fabian Vogt aus der Arbeitsgruppe Jung (Department of Immunology, Universität Tübingen). Entsprechend den Protokollen zur Generierung von Fusionsproteinen der vorherigen Generation (NKG2D-Fc und NKG2D-Fc-ADCC), wurde zur Herstellung der bispezifischen Fusionsproteine die DNA-Sequenz für die Extrazellulärdomäne des NKG2D-Rezeptors an die Sequenz eines gegen CD3- beziehungsweise CD16 gerichteten Antikörpers kloniert.

3.2.1.2. Transfektion von SP2/0-Zellen und Produktion der Fusionsproteine

Zunächst wurden die für die Transfektion notwendigen nativen SP2/0-Zellen aufgezogen, um für den Zeitpunkt der Transfektion etwa 2×10^7 Zellen zu haben, die sich in der sogenannten exponentiellen Wachstumsphase befinden.

Um die geschlossene Ring-Struktur der Expressionsvektoren für den Einbau in die DNA der Transfektanten zu linearisieren, wurde ein Übernacht-Verdau bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Ahd I durchgeführt. Danach erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, um Verunreinigungen zu beseitigen. Hierfür wurde der DNA-Lösung 1 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung zugesetzt, das Gemisch gevortext und anschließend zentrifugiert. Die DNA-haltige, wässrige Phase wurde entnommen und zweimal mit Chloroform (1:1) gewaschen, um Phenolreste zu entfernen. Im Anschluss wurde der DNA-Lösung im Verhältnis 2,5:1 eiskaltes Ethanol (100%) sowie im Verhältnis 0,1:1 3 M Natriumacetat-Lösung zugesetzt und das Ganze bei -80°ÜN zur Ausfällung inkubiert. Nach der Zentrifugation am nächsten Tag, wurde das Pellet erneut mit 70% Alkohol (eiskalt) gewaschen, im Anschluss unter der Sterilbank getrocknet und zum Schluss in Aqua dest. gelöst.

Die für die Transfektion verwendeten SP2/0-Ag14 Zellen wurden dreimal mit reinem IMDM-Medium gewaschen, ausgezählt und mit 2×10^7 Zellen in 250 μl IMDM-Medium (serumfrei) in eine zuvor gekühlte Elektroporations-Küvette aufgenommen. Dazu wurde die linearisierte DNA

gegeben und das Gemisch fünf Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte bei 975µF und 230V in Zusammenarbeit mit der AG Jung.

Um im Anschluss Einzelklone heranzuziehen und eine Monoklonalität der Fusionsproteine erreichen zu können, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu wurden die Transfektanten in 10ml IMDM-Medium aufgenommen und insgesamt acht 96 well-Flachbodenplatten komplett mit Verdünnungen von 1:2 bis 1:256 in je 50µl/Well pipettiert. Nach 48-stündiger Inkubation bei 37°C wurde G418 in der Endkonzentration von 1mg/ml hinzugefügt. Da die erfolgreich transfizierten SP2/0-Ag14-Zellen aufgrund des eingeschleusten Plasmids eine Resistenz gegen dieses Antibiotikum besitzen, kann G418 zur Selektion genutzt werden. Zur Identifikation potenzieller Einzelklone wurde acht bis zehn Tage später eine lichtmikroskopische Untersuchung durchgeführt. Es konnten je 40 Einzelklone der NKG2D-CD3-transfizierten als auch der NKG2D-CD16-transfizierten Zellen extrahiert werden. Diese wurden in 48 well-Flachbodenplatten mit Zugabe von 150µl IMDM Komplettmedium mit G418 eine weitere Woche expandiert. Währenddessen wurden die Kulturüberstände der Einzelklone auf Qualität und Quantität des Fusionsproteins via FACS und ELISA überprüft. Das Bindungsprofil der Fusionsproteine wurde sowohl auf die Zielseiten- als auch auf die Effektorseiten-Bindung mittels MICA- sowie SP2/0-CD3- und SP2/0-CD16-Transfektanten in der Durchflusszytometrie untersucht. Mittels ELISA-Untersuchung wurde die Spezifität der Zielseiten-Bindung auf NKG2D-Ligand-*gecoateten* Platten anschließend noch sensitiver bestätigt.

So konnten für beide Fusionsproteine je 3 geeignete Einzelklone identifiziert werden, die zur Produktion in großen Zellkulturflaschen herangezogen wurden. Darüber hinaus wurde von Beginn an Zellmaterial der ausgewählten Klone zur Absicherung bei -196°C eingefroren.

3.2.1.3. Herstellung und Aufreinigung der Fusionsproteine

Initial wurde sowohl ein NKG2D-CD3 als auch ein NKG2D-CD16 Einzelklon auf $0,5 \times 10^6$ /ml in jeweils 12 Zellkulturflaschen à 12 ml eingestellt (IMDM Komplettmedium + G418) und dann alle zwei bis drei Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet. Die übrigen Zellen wurden zusammen in zwei Totwachs-Kulturen à 100ml überführt und ohne G418 für weitere sieben bis zehn Tage bei 37° inkubiert. Danach wurden die Totwachs-Überstände zentrifugiert (1500rpm/5min) und steril filtriert (Sterilfilter, Porengröße 0,22µm); es wurde NaN_3 hinzugegeben und mit einer Endkonzentration von 0,01% bei 4°C gelagert.

Die über eine Woche gesammelten Kulturüberstände für NKG2D-CD3 und NKG2D-CD16 wurden dann, pH-Meter kontrolliert, auf pH = 8 eingestellt und der Aufreinigung zugeführt. Diese erfolgte über eine sogenannte Säulen-Chromatographie mit einer Protein A-Säule. Hierzu wurde die in Alkohol eingelegte Säule zunächst mit Aqua dest. gespült, dann folgte (Durchfluss-spektrometrisch kontrolliert bei 280nm) die Auftragung des Fusionsproteins (auf Eis gekühlt) mit einer Flussgeschwindigkeit von 0,5ml/min über mindestens 24 Stunden (teilweise *ge looped*). Im Anschluss wurde das System mit 0,1 M Phosphatpuffer bei pH 8 gespült, um unspezifisch gebundene Proteine auszuwaschen. Die spezifisch gebundenen Proteine wurden im Anschluss mit zuvor frisch hergestelltem 0,1 M Glycin-Puffer bei pH 2,4 eluiert. Die spektrometrisch kontrolliert, in einer Phase ausgelösten Fusionsproteine, wurden im Anschluss manuell in einen Dialyse-Schlauch überführt und bei 4°C auf dem Magnetrührer über Nacht in einem Liter PBS dialysiert und abgepuffert. Im Anschluss erfolgte eine Sterilfiltration bei einer Porengröße von 0,22µm und die Überführung in ein Proteinase-freies NUNC-Gefäß.

Vor der weiteren experimentellen Überprüfung erfolgte zunächst ein Endotoxintest per LAL (Kit von Lonza, Walkersville, MD, USA). Fusionsprotein-Chargen, die hierbei Endotoxin-Spiegel unter 1 EU/mg aufwiesen, konnten für *in vitro* Experimente verwendet werden und wurden dauerhaft bei 4°C gelagert. Enthielten sie höhere Endotoxin-Spiegel, wurden sie zuvor *gedetoxed* und im Anschluss erneut gelallt.

3.2.2. Zellbiologische Methoden

3.2.2.1. Zellkultur

Jede Form der Zellkultur wurde bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Inkubatoren kultiviert. Die Zählung erfolgte lichtmikroskopisch, mit Trypanblau verdünnt, auf Neubauer-Zählkammern. Standardmäßig zentrifugiert wurde mit 1500 rpm, 5 Min bei 22°C.

Für alle Zellkulturen gilt soweit nicht anders angegeben, dass das Medium jeweils montags, mittwochs und freitags gewechselt wurde. Alle verwendeten Zelllinien waren entweder semiadhärent und konnten durch vorsichtiges Beklopfen der Zellkulturflaschen gelöst werden oder aber Suspensionszellen, die frei im Nährmedium vorliegen. Die Zellen wurden im alten Medium in 15 ml Falcons überführt, wie zuvor angegeben herunterzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Optional konnte ein weiterer Waschgang mit PBS durchgeführt werden,

oder es erfolgte sofort eine Zählung und Neueinstellung der Zellen auf $0,5 \times 10^6$ Zellen/ml in 12 ml frischem Medium pro Zellkultur.

Hauptsächlich wurden Transfektanten der Zelllinie SP2/0-Ag14 verwendet. Diese wurden als Varianten in SP2/0-CD16, SP2/0-CD3 und natürlich als Produzenten der Fusionsproteine genutzt. Kultiviert wurden sie in IMDM + 10% FCS + 1% Pen-Strep + 1% Na-Pyruvat + 1% NEAA + G418 (1:50).

Damit sich die für Versuche benötigten Zellen am Versuchstag in der Wachstumsphase befanden, wurden diese Zellen am Vortag mit frischem Medium versorgt.

3.2.2.2. Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte lichtmikroskopisch mittels Neubauerzählkammer. Hierzu wurde die Zellsuspension im Verhältnis 1:2 oder 1:10 mit einer 0,1%igen Trypanblaulösung angefärbt. Tote Zellen nehmen Trypanblau durch die gestörte Membranintegrität auf. Gezählt werden nur lebende, unter dem Mikroskop weißlich erscheinende Zellen. Die Zellzahl wird anschließend mit folgender Formel berechnet:

Lebendzellzahl/ml Zellsuspension = Lebendzellzahl pro Großquadrat x Verdünnungsfaktor (Trypanblau) x Volumenfaktor der Zählkammer (10^4)

3.2.2.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen der Kulturflasche entnommen, gewaschen und gezählt, eingestellt und rasch in das DMSO-haltige Einfriermedium aufgenommen, dann mit 5×10^6 Zellen/ml in ein steriles Cryoröhrchen (1 ml) transferiert und bei -80°C eingefroren. Zur längerfristigen Konservierung wurden die Tubes nach einigen Tagen in flüssigen Stickstoff bei -196°C überführt.

Zum Auftauen von Zellen wurden die Tubes im 37°C warmen Wasserbad wenige Sekunden aufgetaut, dann unter der Sterilbank geöffnet und mit zuvor erwärmtem Medium resuspendiert (1ml Tubeinhalt + 9ml Medium). Damit wurde das DMSO bereits verdünnt und im Anschluss auch durch Zentrifugation und die Aufnahme in neues Medium entfernt, bevor die Zellen ohne Zugabe von G418 in Zellkulturflaschen im Inkubator kultiviert wurden.

3.2.2.4. Kultur der Antikörper-produzierenden Zellen

Zur Antikörperproduktion wurden ausschließlich transfizierte SP2/0 Zellen genutzt. Diese wurden in IMDM-Komplettmedium in großen Kulturflaschen unter Zugabe von G418 zur Selektion kultiviert. Der Überstand wurde nach circa 7 Tagen entnommen und tote Zellen abzentrifugiert. Die somit fast zellfreien Überstände wurden steril filtriert (Porengröße 0,22µm) und bis zur Aufreinigung bei 4°C mit 0,01% NaN₃ gelagert.

3.2.2.5. Periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)

Die Blutproben von gesunden Spendern stammten allesamt von der Blutbank der Universitätsklinik Tübingen und wurden in heparinierter Form geliefert. Patientenblutproben wurden von den zuständigen Assistenzärzten der Hämatologisch/Onkologischen Abteilung des Universitätsklinikums Tübingen ebenfalls in heparinierter Form an unser Labor weitergegeben und sofort aufgearbeitet. Alle angenommenen und verwendeten Blutproben wurden anonymisiert und dokumentiert.

Um die Leukozyten bzw. mononukleären Zellen zu isolieren, wurde das Spendermaterial etwa 1:3 mit PBS verdünnt, dann vorsichtig mit je 35 ml auf eine isotonische Ficoll-Hypaque-Lösung (15ml, Biocoll™ Separation Solution) aufgetragen und durch Zentrifugation (2000rpm, 18 min, ohne Bremse) aufgrund der unterschiedlichen Dichtegradien voneinander getrennt. Das Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer der Ficoll-Lösung (1,077g/ml) sorgt während der Zentrifugation für eine spezifische Trennung der Erythrozyten (am Boden) von den Thrombozyten (im Plasma) und den mononukleären Zellen in der Interphase dazwischen. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den darin enthaltenen Leukozyten und Monozyten entnommen, insgesamt dreimal in PBS aufgenommen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min), bevor in einem letzten Waschgang (Zentrifugation bei 800 rpm, 10 min) noch enthaltene Thrombozyten entfernt wurden. Im Anschluss wurden die Zellen gezählt und entsprechend des Verwendungszwecks in Kulturmedium oder PBS aufgenommen oder eingefroren.

3.2.2.6. Generierung von polyklonalen NK Zellen (pNKC)

Polyklonale NK Zellen werden aus den zuvor isolierten PBMC von gesunden Spendern gewonnen. Hierzu werden die PBMC mit einer Dichte von 1×10^7 Zellen/ml auf 10 ml in einer Zellkulturflasche für 1h bei 37°C im Brutschank inkubiert. In dieser Zeit setzen sich die Monozyten auf der Oberfläche der Flasche ab und adhären dort, sodass nach der Inkubation

der Überstand vorsichtig entnommen und zentrifugiert werden kann. Dieser enthält nun hauptsächlich Leukozyten und kann in Kulturmedium aufgenommen werden. Dazu werden die Zellen erneut gezählt und auf 8×10^5 Zellen/ml eingestellt. Den so eingestellten Kulturen werden 2mM L-Glutamin/ml und 50 U IL-2/ml hinzugegeben. Um die NK Zellen weiter zur Proliferation anzuregen, werden sie mit sogenannten Feeder Zellen (Zelllinie K562-41BBI-IL15) zusammen kultiviert. Die Feeder Zellen werden zuvor mit 30 Gray bestrahlt, um ihre eigene Proliferation zu verhindern, gewaschen und mit 2×10^5 Zellen/ml in Kulturmedium mit 2mM L-Glutamin/ml angesetzt.

Die pNKC-Kulturen werden anschließend in 24 well-Platten angesetzt, von denen jeweils die äußeren Wells mit einem Verdunstungsschutz von je 600 μ l PBS befüllt werden. Die acht übrigen, innen gelegenen Wells, werden nun mit je 500 μ l beider Zellsuspensionen benetzt. Die Platten werden für insgesamt 10 Tage bei 37°C inkubiert, wobei alle zwei Tage den mit Zellmaterial versehenen Wells 200 μ l Überstand entnommen und mit 200 μ l frischem Medium (mit 25 U IL-2/ml) aufgefüllt wird. Die so generierten polyklonalen NK Zellen werden am zehnten Tag mittels Durchflusszytometrie auf ihre Reinheit überprüft. Für die durchgeführten Experimente betrug die Reinheit der pNKC immer mindestens 85%.

3.2.3. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS) dient der Detektion der Expression von membranständigen und nichtmembranständigen Proteinen und kann beispielsweise zur Bestimmung des Zelltyps, des Aktivierungslevels, Status der Maturation und verschiedener Expressionslevel und Muster dienen. Hauptsächlich wurden hierfür das BD FACS Canto II (Auswertung mittels FlowJo 7.6) sowie das Cytomics FC 500 (Auswertung mittels integrierter Software) genutzt.

Das allgemeine Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Bindung zwischen Antikörper (mit einem Farbstoff markiert) und Antigen (auf bzw. in der Zelle). Die gesuchten Zielmoleküle, in unserem Fall auf der Zelloberfläche exprimiert, werden mit einem spezifischen Antikörper abgegriffen. Der Antikörper kann direkt mit einem Fluorochrom-Farbstoff gekoppelt sein oder er wird durch einen zweiten, für ihn spezifischen Antikörper (der dann mit einem Farbstoff gekoppelt ist), abgegriffen. Die so mit Antikörpern besetzten Zellen werden im Anschluss mittels hydrodynamischer Fokussierung durch einen gebündelten Laserstrahl (mit verschiedenen Farben) gespült. Dadurch kommt es zur Anregung der auf den Antikörpern befindlichen Fluoreszenzfarbstoffe, die dadurch Licht einer für sie spezifischen Wellenlänge emittieren. Aufgefangen durch ein komplexes System aus Filtern und Spiegeln, bekommt das FACS ein für jede Wellenlänge spezifisches Signal über das Vorhandensein oder das Fehlen

des Antiköpers auf den gemessenen Zellen. Bereits ohne Antikörper ist es mittels Durchflusszytometrie möglich über Größe, Granularität und Vitalität grobe Aussagen über die Zellen und deren Herkunft zu machen.

Um eine unspezifische Bindung der Fusionsproteine weitestgehend zu verhindern, wurden die zu färbenden Zellen vor Beginn der Färbung durch Zusatz von hlgG (10µg/ml) zum FACS-Puffer eine halbe Stunde bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Zum Ausschluss eventueller weiterer unspezifischer Bindungen, wurde für jeden Antikörper beziehungsweise jedes Fusionsprotein eine spezifische Isotyp-Kontrolle verwendet und mitgefärbt. Wenn keine human-spezifischen Sekundärreagenzien genutzt wurden, wurden Antikörperverdünnungen mit FACS-Puffer mit humanem IgG (10µg/ml) angesetzt.

Nach dem Zählen und Blocken der Zellen wurden sie auf eine Zellzahl von $0,1-0,4 \times 10^6$ pro Well eingestellt und auf 96 well-Rundbodenplatten übertragen in der die Färbung durchgeführt wurde. Standardmäßig wurden diese FACS-Platten mit 2000 rpm bei 2 Minuten zentrifugiert und im Anschluss der Überstand abgeschüttet. Nach jedem Färbeschritt wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen. Gefärbt wurde nach dem entsprechenden Protokoll:

1. Färbung: Primäre, unmarkierte Antikörper in entsprechender Konzentration (1µg/ml oder 10 µg/ml; Isotypen ebenso); Inkubation 20 Minuten bei RT, dunkel, 2x waschen im Anschluss
2. Färbung: Sekundäre, markierte Antikörper in entsprechender Konzentration (1:100 oder Herstellerangaben); Inkubation 15 Minuten bei RT, dunkel, 2x waschen im Anschluss
3. Färbung: Direkt-markierte Antikörper in entsprechender Konzentration (nach Herstellerangaben), Inkubation 12 Minuten bei RT, dunkel, 2x waschen im Anschluss
4. Färbung: Lebend-tot mit 7-AAD

Nach dem letzten Waschgang wurde der Inhalt jedes Wells in je 150µl FACS-Puffer resuspendiert und komplett in die dafür vorgesehenen FACS-Röhrchen überführt. Hiernach konnten die Proben, wenn nötig, bis zur Messung für einige Stunden dunkel bei 4°C gelagert werden. Unmittelbar vor der FACS-Untersuchung kam zumeist die 7-AAD-lebend-tot-Färbung in weiteren 150µl mit einer Endkonzentration von 10µl/ml hinzu. Die Inkubationszeit betrug mindestens 7 Minuten im Dunkeln auf Eis. Danach konnte gemessen werden.

3.2.4. BATDA-Europium-Assay zur NK Zell-Zytotoxizität

Um die Zytotoxizität der NK Zellen nativ und in Verbindung mit den generierten Fusionsproteinen zu untersuchen, wurden sogenannte Europium-Assays durchgeführt. Dafür wurden die Zielzellen in verschiedenen Ansätzen ohne, sowie mit NK Zellen in verschiedenen Ratios angesetzt. Gemessen wird der Zerfall der Zielzellen nach einer gewissen Inkubationszeit anhand eines Chelat-Komplexes (EuTDA), der in Korrelation zur zerfallenen Zellzahl fluoresziert.

$$\text{Lyse[\%]} = (\text{Wert}_{\text{Probe}} - \text{Wert}_{\text{spontan}}) / (\text{Wert}_{\text{maximal}} - \text{Wert}_{\text{spontan}}) \times 100$$

Die Zielzellen wurden dafür zunächst mit BATDA (2,2':6',2''-terpyridine-6,6''dicarboxylacid acetoxymethylester) eine Stunde bei 2×10^6 Zellen/ml in 2 ml Kulturmedium mit insgesamt 4 μl BATDA-Lösung (2 μl BATDA/ml Medium) unter regelmäßigem Schütteln für 1 Stunde bei 37°C vorinkubiert. Nach der Inkubation folgten fünf Waschgänge mit angewärmtem Medium, um das überschüssige BATDA zu entfernen. Zentrifugiert wurde hierbei jeweils mit 300g für 7 Minuten. Danach wurden die Zielzellen auf 5×10^4 Zellen/ml eingestellt und je nach Experiment zusätzlich noch mit Fusionsproteinen vorinkubiert oder bis zur Verwendung weiter im Brutschrank aufbewahrt. Bei Behandlung mit Fusionsproteinen wurden die Zielzellen für eine halbe Stunde bei 37°C mit unterschiedlichen Konzentrationen noch einmal vorinkubiert. In der Zwischenzeit wurden die Effektorzellen (NK Zellen) gewaschen, gezählt und für die gewünschten Ziel-Effektor-Zell-Verhältnisse (E:T Ratio) angesetzt. Diese wurden dann in einem Volumen von je 100 μl /Well in die vorbereiteten 96 well-Rundboden-Platten pipettiert. Um den sogenannten Spontanrelease sowie den Maximalrelease zu erhalten, wurden jeweils Wells mit 100 μl reinem Medium sowie Wells mit 100 μl 1%-ige Triton X-100 (maximal lysierende Wirkung) angesetzt. Zuletzt wurden nun die Zielzellen mit einer Zellzahl von 5×10^3 /Well in je 100 μl Medium zugesetzt, die Platten zusätzlich schonend mit 100g für 2 Minuten herunterzentrifugiert und für weitere 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, diesmal bei 200g für 5 Minute, dann 20 μl des Überstandes entnommen und in eine 96 well-Flachboden-Platte transferiert sowie im Anschluss mit der bereits vorgelegten Europium-Lösung (200 μl /Well) gemischt. Die Fluoreszenz wurde anschließend im Multilabel-Counter Viktor der Kinderklinik des UKT gemessen.

3.2.5. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Dieses immunologische Verfahren dient dem qualitativen und quantitativen Nachweis von unterschiedlichsten Molekülen mittels enzymatischer Farbreaktion. Das Verfahren bedient sich der sogenannten Sandwich-Methode. Dabei wird eine 96 well-Flachbodenplatte zunächst mit sogenannten primären Antikörpern *gecoated*, die spezifisch bestimmte Zielantikörper abgreifen können. Im Anschluss wird mit IgG-Antikörpern geblockt, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nach einigen Waschschritten wird dann die eigentliche Probe hinzugegeben und inkubiert. Nach der Inkubation werden in mehreren Waschschritten nicht gebundene Antikörper/Antigene ausgewaschen. Zur Detektion der gebundenen Antigene werden nun Teile der Ziel-Antigene mit einem sekundären Antikörper abgegriffen. Es entsteht ein sogenannter Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Der sekundäre Antikörper ist Biotin-markiert und kann im Anschluss mit Streptavidin-HRP abgegriffen werden, oder es kommt ein tertiärer HRP-gekoppelter Antikörper zum Einsatz. Mit dem chromogenen 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) wird dann das HRP enzymatisch aktiviert und es kommt zu einem Farbumschlag entsprechend der Quantität des gebundenen Ziel-Antigens. Diese Reaktion wird dann mit Phosphorsäure beendet und der Farbumschlag im ELISA-Reader gemessen. Die Fluoreszenzbestimmung durch den ELISA-Reader ermöglicht im Anschluss die Berechnung der Antigen-Konzentration für jedes Well.

3.2.6. Fusionsprotein-ELISA

Zur Quantitäts- und Qualitätsüberprüfung der hergestellten Fusionsproteine wurde ein besonderes ELISA-Verfahren etabliert. Hierfür wurden 96 well-NUNC-ELISA-Platten mit den entsprechenden humanen anti-NKG2D-Antikörpern bei einer Konzentration von 2µg/ml mit 100µl/Well über Nacht bei Raumtemperatur oder für 1h bei 37 Grad *gecoated*. Im Anschluss wurde dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen. Es folgte das Blocken mit 7,5%igem BSA-PBS für 1,5 h bei Raumtemperatur. Auch hiernach wurde dreimal gewaschen. Dann wurden die entsprechenden Proben mit NKG2D-CD3 oder NKG2D-CD16 Fusionsproteinen hinzugegeben. Diese wurden über 1,5h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper in vier Waschschritten abgespült. Das gebundene Fusionsprotein wurde im Anschluss mit *goat-anti-human*-Peroxidase-gekoppelten Antikörpern abgegriffen, die für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubierten. Nach der Inkubation erfolgten fünf weitere Waschschrritte bevor die chromogene Reaktion mittels TMB ausgelöst wurde. Die TMB-Lösung wurde mit 100µl/Well für 5 bis 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach makroskopischer Kontrolle eines stattgefundenen Farbumschlags wurde die Reaktion mit Phosphorsäure gestoppt und die Platte sofort im ELISA-Reader bei 450nm gemessen.

3.2.7. Humane Zellen aus Patienten-Blutproben

Für Experimente mit humanem Blut beziehungsweise mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), wurden Blutproben von erwachsenen, gesunden Spendern als auch von AML-Patienten, die entsprechend den Richtlinien der Ethikkommission zuvor freiwillig und schriftlich eingewilligt hatten, entnommen. Die Blut- und oder Knochenmarksproben wurden sofort nach Diagnosestellung und vor Therapiebeginn entnommen.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der NKG2D-Konstrukte

In der folgenden Abbildung sind die NKG2D-Fusionsproteine schematisch dargestellt. Die extrazelluläre Domäne des Typ-II Transmembranproteins NKG2D ist hierbei mittels eines CH₂-Linkers C-terminal an ein Fab-Fragment fusioniert. Je nach Spezifität des Fab-Fragments (entweder gegen CD3 oder CD16 gerichtet) entsteht so ein NKG2D-CD3 oder ein NKG2D-CD16 Fusionsprotein.

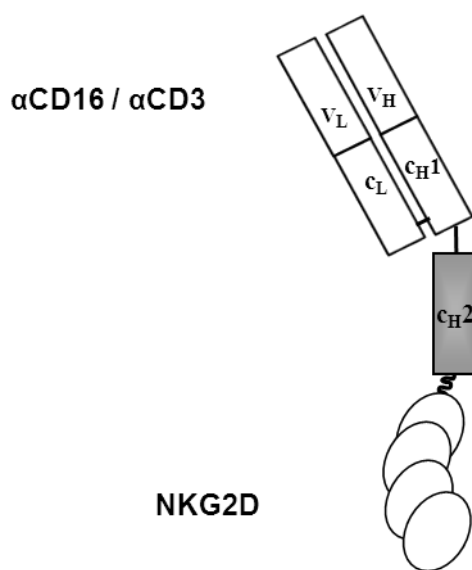


Abbildung 3: Aufbau der NKG2D-Fusionsproteine.

4.1.1. Spezifität der NKG2D-Fusionsproteine

Nach erfolgreicher Herstellung wurde in einem ersten Versuch überprüft, ob die neu generierten Fusionsproteine in der Lage sind, mittels der extrazellulären Domäne des Immunrezeptoranteils (NKG2D) an die entsprechenden Zielliganden zu binden. Dazu wurden MICA exprimierende C1R-Transfektanten als Zielzellen verwendet und die Bindung der Konstrukte mittels FACS analysiert. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4 dargestellt.

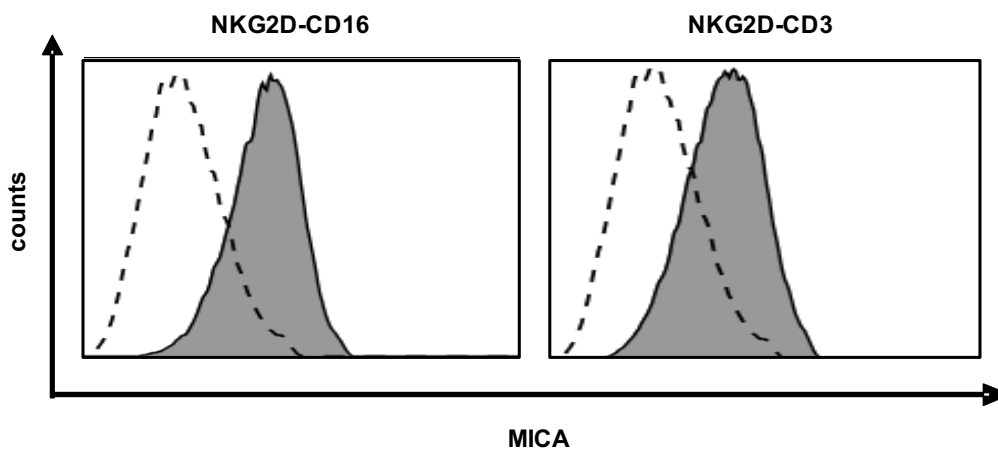


Abbildung 4: Bindung der NKG2D-Fusionsproteine an MICA-Transfektanten.

MICA-transfizierte C1R-Zellen wurden mit Fusionsproteinen inkubiert und die Bindung an die Transfektanten im Anschluss mittels eines sekundären (human-spezifischen) Antikörpers im FACS nachgewiesen (ausgefüllte Histogramme). Als Negativkontrolle diente ein gegen EGFR gerichtetes, bispezifisches Fusionsprotein (entweder anti-CD3 oder anti-CD16, offene Histogramme). Gezeigt sind beispielhafte Daten eines Experiments aus einer Reihe von Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

Im Vergleich zur Negativkontrolle ist die Bindung beider NKG2D-Konstrukte an die Transfektanten deutlich zu erkennen. Somit konnte die Bindung der extrazellulären Domäne des Immunrezeptors NKG2D an seine Liganden (hier MICA) nachgewiesen werden.

In einem weiteren Versuch sollte nun die Spezifität der immunstimulierenden Seite (CD3 und CD16) an die jeweiligen Zielzellen (NK oder T Zellen) nachgewiesen werden. Dazu wurde die Bindung der beiden Konstrukte mittels PBMCs gesunder Spender durchflusszytometrisch bestimmt. In Abbildung 5 ist zunächst die CD16 vermittelte Bindung an NK Zellen zu sehen.

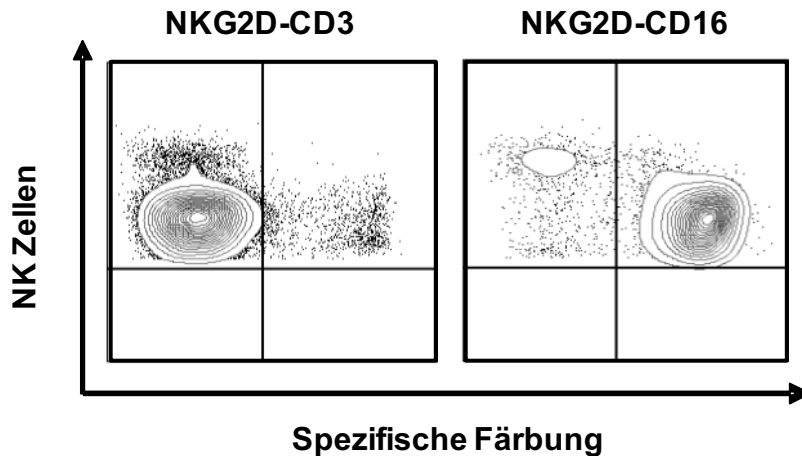


Abbildung 5: Spezifität des NKG2D-CD16 Fusionsproteins.

PBMC gesunder Spender wurden mit den beiden Fusionsproteinen inkubiert und die Bindung nach einem Färbeschritt mittels eines sekundären (human-spezifischen) Antikörpers im FACS auf NK Zellen ($CD56^+CD3^-$) analysiert. Gezeigt sind beispielhafte Daten aus einer Reihe von Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen.

In Abbildung 5 ist zu sehen, dass das NKG2D-CD16 Konstrukt spezifisch an den CD16-Rezeptor (FcγRIIIA) der NK Zellen bindet, während für das NKG2D-CD3 Konstrukt dementsprechend keine Bindung zu sehen ist. In Abbildung 6 ist umgekehrt die spezifische Bindung der NKG2D-CD3 Konstrukte auf den beiden wichtigsten T Zell-Populationen zu sehen. Hier fungiert NKG2D-CD16 als Negativkontrolle.

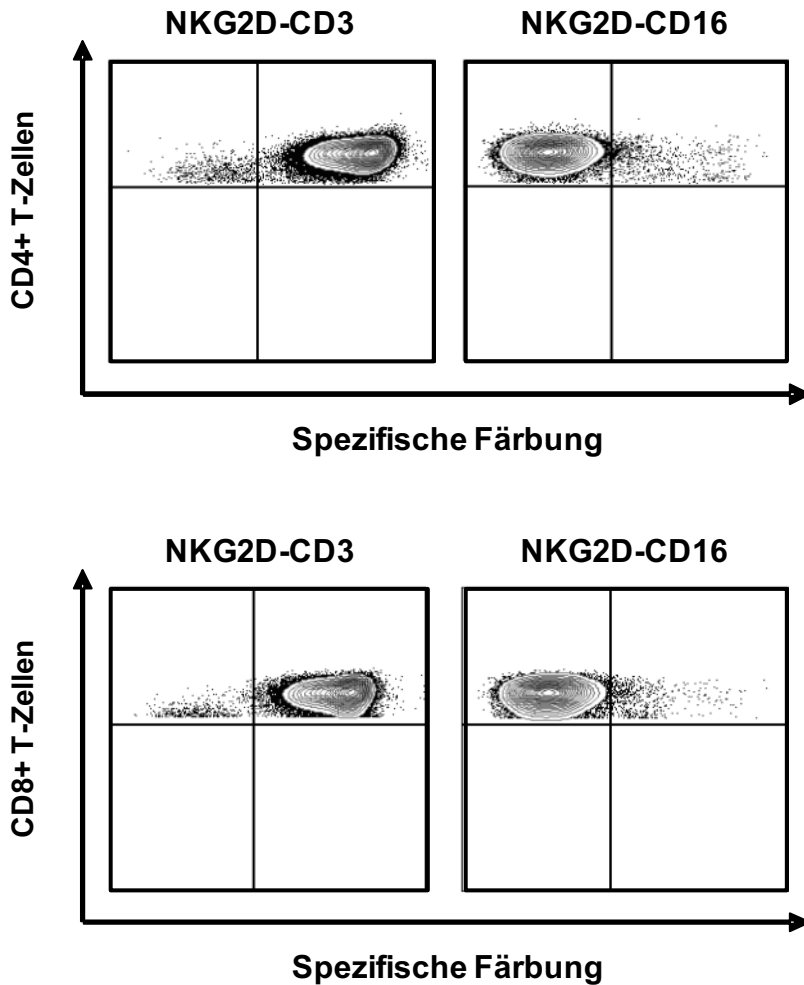


Abbildung 6: Spezifität des NKG2D-CD3 Fusionsproteins.

PBMC gesunder Spender wurden mit den beiden Fusionsproteinen inkubiert und die Bindung nach einem Färbeschritt mittels eines sekundären (human-spezifischen) Antikörpers im FACS auf T Zellen ($CD4^+$ T Helferzellen, $CD8^+$ zytotoxische T Zellen) analysiert.

Für das NKG2D-CD3 Konstrukt konnte eine spezifische Bindung an den CD3-Rezeptor von $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen gezeigt werden, während für NKG2D-CD16 dementsprechend keine Bindung zu sehen ist. Somit konnte für beide Fusionsproteine eine spezifische Bindung an ihre jeweiligen Effektorzellen gezeigt werden.

4.2. Affinitätsvergleich von NKG2D-CD16 und NKG2D-ADCC zum Fc-Rezeptor

In Vorarbeiten wurde bereits ein monospezifisches, Fc-optimiertes NKG2D-Fusionsprotein zur Induktion von ADCC durch NK Zellen generiert (NKG2D-ADCC). Das neu hergestellte, bispezifische Fusionsprotein NKG2D-CD16 sollte mit seinem CD16 spezifischen Fab-Fragment über eine höhere Affinität zum CD16-Rezeptor verfügen, als das Fc-optimierte NKG2D-ADCC.

Um dies zu überprüfen, wurde eine Dosistitration für beide Konstrukte auf polyklonalen NK Zellen (pNKC) durchgeführt (Abbildung 7).

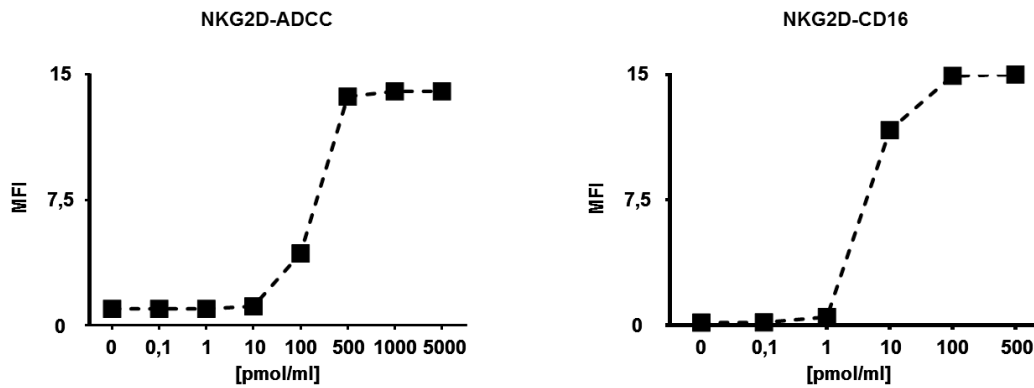


Abbildung 7: Dosistitration des NKG2D-ADCC im Vergleich zu NKG2D-CD16 auf pNKC.

pNKC wurden mit ansteigenden Konzentrationen von NKG2D-ADCC (links) oder NKG2D-CD16 (rechts) inkubiert und die Bindung an NK Zellen (CD56⁺CD3⁻) und somit den Fc-Rezeptor nach einem weiteren Färbeschritt mittels eines sekundären (human-spezifischen) Antikörpers durchflusszytometrisch bestimmt.

Dabei zeigte sich für NKG2D-ADCC eine saturierende Konzentration bei ca. 500 pmol/ml, während NKG2D-CD16 bereits bei einer Konzentration von ca. 100 pmol/ml die Sättigung erreichte. Daraus lässt sich auf eine höhere Affinität von NKG2D-CD16 im Vergleich zu NKG2D-ADCC für den Fc-Rezeptor auf NK Zellen schließen.

4.3. Zytotoxizitäts-Assays

Nachdem gezeigt werden konnte, dass beide Konstrukte spezifisch an ihre Effektorzellen binden, sollte mittels verschiedener Versuche das immunstimulatorische und zytotoxische Potential der Fusionsproteine überprüft werden. Hierzu wurden sowohl erneut MICA-Transfektanten als auch Blutproben von neu diagnostizierten, initial unbehandelten AML-Patienten genutzt. Die Zielzellen (Transfektanten oder AML-Zellen) wurden mit den entsprechenden Fusionsproteinen entweder im allogenen Setting (durch die Zugabe von pNKC) oder im autologen Setting behandelt und die Lyse der Zielzellen gemessen.

4.3.1. Modulation der NK Zell-Zytotoxizität durch die NKG2D-Fusionsproteine im allogenen Setting

In einem ersten Versuchsansatz sollte überprüft werden, inwieweit die Zytotoxizität von NK Zellen gegenüber Zielzellen durch die Fusionsproteine moduliert werden kann. Dazu wurden pNKC als Effektorzellen sowie MICA-transfizierte C1R-Zellen als Zielzellen verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 zu sehen.

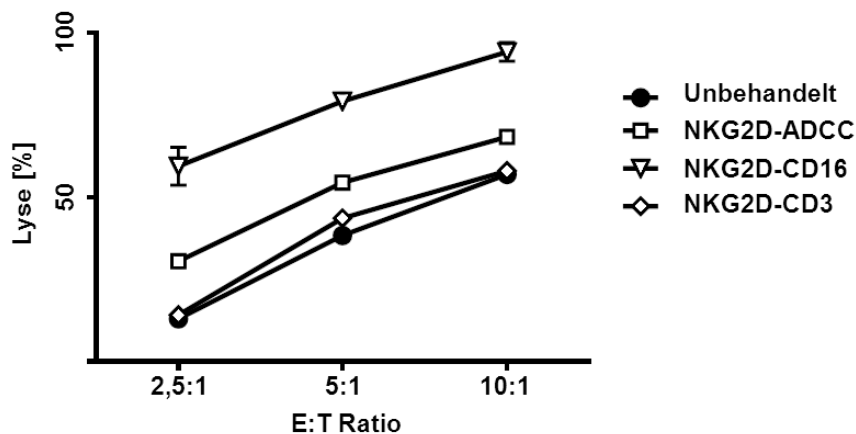


Abbildung 8: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch die NKG2D-Fusionsproteine gegen MICA-Transfektanten.

MICA-transfizierte C1R-Zellen wurden mit den verschiedenen Fusionsproteinen (je 10 µg/ml) inkubiert und in einem 2 h BATDA-Europium-Assay mit allogenen pNKC untersucht.

In dem Zytotoxizitätsassay war eine deutliche Steigerung der Lyse der MICA-Transfektanten, bereits durch das monospezifische Fusionsprotein NKG2D-ADCC zu beobachten. Diese Effekte wurden allerdings bei weitem durch die NKG2D-CD16 vermittelte Lyse übertroffen. In Gegenwart von NKG2D-CD3 zeigte sich, wie zu erwarten, keine gesteigerte Lyse, da es in diesem Assay als Negativkontrolle dient.

4.3.2. Modulation der T Zell-Zytotoxizität durch die NKG2D-Fusionsproteine im autologen Setting

Um in vitro der Situation im menschlichen Körper näher zu kommen, sollte das Potential der NKG2D-Fusionsproteine in einem autologen Experiment untersucht werden. Hierbei kann spezifisch die Lysierung der AML-Zellen durch patienteneigene Effektorzellen unter Behandlung mit NKG2D-Fusionsproteinen beobachtet werden. In diesen FACS-basierten Experimenten wurden PBMC von AML-Patienten für drei Tage mit NKG2D-CD3 behandelt. Nach der Inkubation erfolgte durchflusszytometrisch die Bestimmung der noch viablen AML-Zellen in den jeweiligen Proben. Im Vergleich zu einem unbehandelten Kontrollansatz kann somit das Lysierungspotential der Fusionsproteine gezeigt werden. Dieser Ansatz konnte allerdings nur mit NKG2D-CD3 durchgeführt werden, da die Proteinmenge von NKG2D-CD16 limitiert war und somit erst neu produziert werden musste. Für die Versuche wurden Patienten ausgewählt, die positiv für NKG2DL waren. Außerdem wurde ein bereits GMP-konform produzierter, bispezifischer Antikörper gegen den FLT3-Rezeptor, welcher häufig auf AML-Patientenzellen überexprimiert wird und deshalb als weiteres *Target* zur Antikörperbehandlung evaluiert wird, als Positivkontrolle eingesetzt. Somit wurde für diese Versuche auch die Expression von FLT3 durchflusszytometrisch überprüft. In der folgenden Abbildung 9 ist exemplarisch die Expression der NKG2DL und FLT3 auf den Leukämiezellen eines Patienten dargestellt.

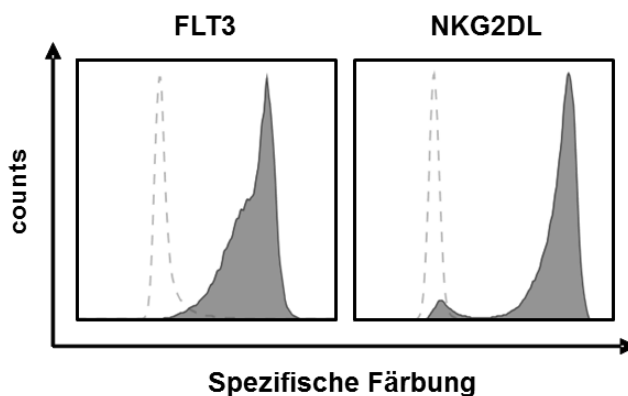


Abbildung 9: Expression der NKG2DL sowie FLT3 auf der Oberfläche der Leukämiezellen eines AML-Patienten.

PBMC eines AML-Patienten wurden entweder mit einem Antikörper-Cocktail gegen NKG2DL (MICA, MICB, ULBP1-3) oder einem FLT3 Antikörper (alle 10µg/ml) inkubiert und danach mittels eines sekundären (murin-spezifischen) Antikörpers abgegriffen (ausgefüllte Histogramme). Die jeweiligen Isotypen sind als offene Histogramme dargestellt. Gezeigt sind beispielhafte Daten einer Experimenten-Reihe mit fünf unterschiedlichen Patienten.

Nachdem die Expression der NKG2DL sowie von FLT3 mittels FACS auf den Patientenzellen überprüft wurde, konnten diese in den FACS-basierten, autologen Zytotoxizitätsassays eingesetzt werden. Um die Blastenreduktion durch die patienteneigenen T Zellen nachzuweisen, wurden die Patientenzellen in Gegenwart des NKG2D-CD3 Fusionsproteins oder des FLT3-CD3 Antikörpers (alle 10µg/ml) für 72 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde für alle Ansätze durchflusszytometrisch die Population der noch verbliebenen lebenden AML- bestimmt. Exemplarisch ist in der folgenden Abbildung die Reduktion der Tumorzellen nach 72-stündiger Inkubation für den oben gezeigten Patienten dargestellt.

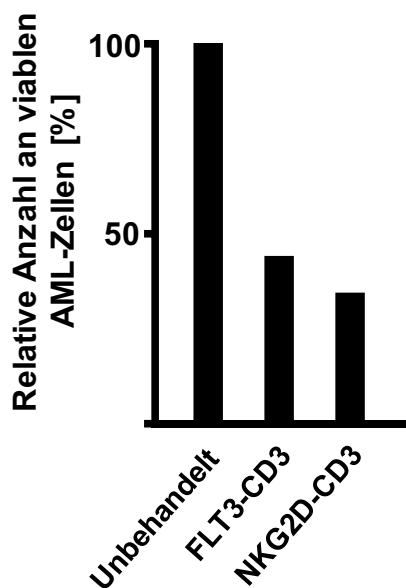


Abbildung 10: Einfluss von NKG2D-CD3 auf die Lyse von AML-Zellen durch autologe T Zellen eines AML-Patienten.

PBMC eines AML-Patienten mit einer Leukämiezellzahl von ca. 50% wurden je nach Ansatz für 72 h mit NKG2D-CD3 oder FLT3-CD3 als Positivkontrolle (je 1 µg/ml) und als Vergleichsansatz unbehandelt inkubiert. In der Durchflusszytometrie erfolgte die Bestimmung der noch viablen AML-Zellen in den einzelnen Proben. In dieser Abbildung ist die Blastenreduktion relativ zu der unbehandelten Probe dargestellt. Gezeigt sind beispielhafte Daten eines Patienten aus einer Experimenten-Reihe mit fünf unterschiedlichen Patienten.

In Abbildung 10 ist eine deutliche Reduktion der Tumorzellen eines AML-Patienten in Gegenwart des NKG2D-CD3 Fusionsproteins zu sehen. Dabei entspricht die Lyse der Tumorzellen nahezu der Lyse, die mit dem FLT3-CD3 Antikörper als Positivkontrolle erzielt werden konnte. Passend zu der in Abbildung 9 gezeigten Expressionsanalyse dieses Patienten, die eine etwas stärkere NKG2DL Expression im Vergleich zu FLT3 vermuten lässt, zeigt sich auch hier eine geringfügig stärkere Lyse durch NKG2D-CD3 als durch FLT3-CD3. Parallel zur

Reduktion der Blasten wurde im selben Ansatz die T Zell Aktivierung anhand der Expression eines spezifischen Aktivierungsmarkers (CD25) nach 72 Stunden ermittelt (Abbildung 11).

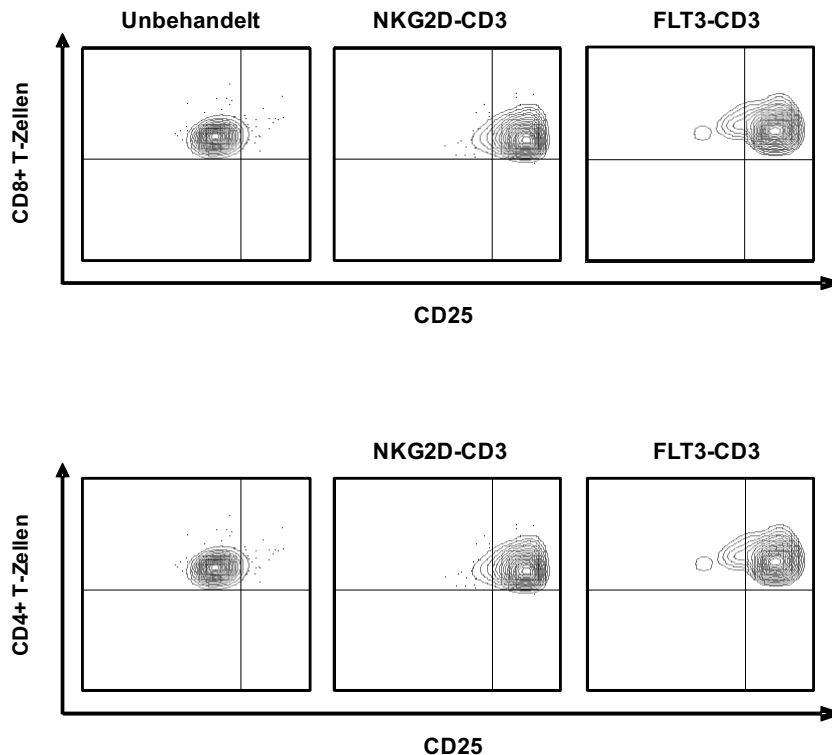


Abbildung 11: Aktivierung der zytotoxischen T Zellen (CD8+, oben) sowie der T Helfer-Zellen (CD4+, unten) mittels des Aktivierungsmarkers CD25 im autologen Setting.

Die Aktivierung der CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen eines AML-Patienten wurde entweder unbehandelt oder nach Behandlung mit NKG2D-CD3 sowie FLT3-CD3 mittels des Aktivierungsmarkers CD25 nach 72h gemessen. Gezeigt sind beispielhafte Ergebnisse einer Experimenten-Reihe mit fünf unterschiedlichen Patienten.

Sowohl für NKG2D-CD3 als auch für FLT3-CD3 zeigte sich eine deutlich gesteigerte Aktivierung der CD4⁺ und der CD8⁺ T Zellen. Die so nachgewiesene, verstärkte Aktivierung der Effektorzellen durch die Fusionsproteine korreliert mit der deutlich gesteigerten Lyse der Tumorzellen. Insgesamt wurden 5 AML-Patienten durchflusszytometrisch auf die Lyse der Tumorzellen in Gegenwart von NKG2D-CD3 untersucht. Alle Patienten exprimierten NKG2DL sowie FLT3 auf ihrer Oberfläche und hatten einen Blasten-Anteil zwischen 20% und 70%. Die Ergebnisse für die autologe Lyse der Tumorzellen sind in Abbildung 12 dargestellt.

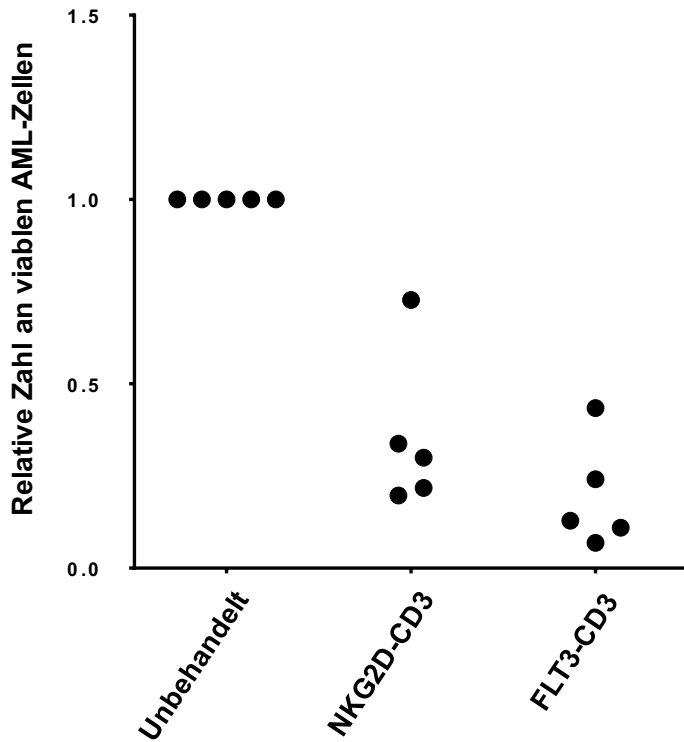


Abbildung 12: Einfluss von NKG2D-CD3 auf die Lyse von AML-Zellen durch autologe T Zellen.

Gezeigt sind die kombinierten Daten der fünf AML-Patienten umfassenden Experimenten-Reihe zur Modulation der autologen T Zell Zytotoxizität durch NKG2D-CD3. Nach 72 stündiger Inkubation des experimentellen Ansatzes mit NKG2D-CD3, der Positivkontrolle mit FLT3-CD3 (je 1 µg/ml) sowie der unbehandelten Negativprobe wurden die absoluten Zahlen der noch viablen AML-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die relativen Zahlen überlebender AML-Zellen in den jeweiligen Ansätzen und die sich daraus ergebende Blastenreduktion für alle fünf Patienten ist hier kombiniert dargestellt.

Für alle Patienten konnte in Gegenwart von NKG2D-CD3 eine deutliche Reduktion der AML-Zellen erzielt werden.

5. Diskussion

Tumoren sind in Deutschland die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Die *immune surveillance* des Immunsystems ist mitentscheidend für die Demaskierung und Elimination entarteter, körpereigener Zellen. Das Immunsystem erkennt dafür spezifisch Oberflächenmoleküle, die von transformierten beziehungsweise infizierten Zellen exprimiert werden, und kann diese Zellen gezielt eliminieren. Tumore, die durch verschiedene Mechanismen die Möglichkeit zum *immune escape* haben, können durch das Immunsystem nicht erkannt und bekämpft werden. Das Verständnis über die Mechanismen des *immune escape* hat daher klinische und therapeutische Relevanz und ist für die erfolgreiche Immuntherapie essentiell.^{52,135,136} Mittels eines besseren Verständnisses der Prozesse, die zur Immunevasion führen, und die dafür verantwortlichen Molekülsysteme, sowie durch die Identifizierung neuer möglichst Tumorzell-restringierter Tumorantigene, können dann neue therapeutische Antikörperformate zur Immuntherapie entwickelt werden.

Monoklonale Antikörper sind seit Jahren ein fester Bestandteil der Therapie maligner Erkrankungen. Tumorspezifische Antikörper wie Rituximab¹³⁷, Trastuzumab¹³⁸⁻¹⁴¹ und Obinutuzumab¹⁴² sind erfolgreiche, zur Therapie zugelassene Antikörper. Obinutuzumab stellt hierbei mit seiner verbesserten Effektorfunktion durch den Fc-optimierten Ig-Anteil schon die sogenannte dritte Generation der Antikörper dar. Somit ist neben der Identifizierung geeigneter Zielantigene für die Antikörpertherapie auch die Optimierung der Rekrutierung der Effektorzellen mittels des Fc-Teils der Antikörper ein erfolgversprechender Ansatz.

Besonders in der Behandlung hämatologischer Tumorerkrankungen kommt der Immuntherapie eine entscheidende Rolle zu. Bisher sind vor allem Antikörper zur Therapie lymphatischer Leukämien zugelassen. So kommt beispielsweise der gegen CD20 gerichtete Antikörper Rituximab regelhaft bei der Behandlung der chronisch lymphatischen Leukämie zum Einsatz. Maligne myeloische Erkrankungen werden derzeit unterschiedlich therapiert. Die chronisch myeloische Leukämie wird entsprechend den Leitlinien mit Tyrosinkinase-Inhibitoren behandelt, was in den letzten Jahren zu einer enormen Verbesserung des Überlebens der betroffenen Patienten geführt hat.

Die Behandlung der AML hingegen hat sich trotz neuer Therapiemöglichkeiten wie beispielsweise die autologe oder allogene Stammzelltransplantation nur geringfügig verbessert. Deshalb stellt die Antikörper-basierte Immuntherapie einen vielversprechenden Ansatz zur Verbesserung der Behandlung der AML dar.

In der Vergangenheit konnte mit NKG2DL ein neues, weitgehend Tumor-restringiertes *target* identifiziert werden. Dabei wird die Expression der NKG2D-Liganden, zu denen die Liganden der MIC- und ULBP-Familie gehören, vor allem durch Stress induziert. So werden NKG2DL von vielen soliden Tumoren, aber auch von allen leukämischen Entitäten exprimiert,^{74,81-83,91-93} wobei ca. 70% aller AML-Patienten eine NKG2DL Expression aufweisen.¹³³ Auf gesundem Gewebe sind sie selten und meist nur gering exprimiert. Somit eignen sich NKG2DL hervorragend als Zielmolekül für immunmodulatorische Therapien.

Das NKG2D/NKG2DL-Molekülsystem spielt physiologisch eine wichtige Rolle für die NK-Zell-Reaktivität. NK Zellen, als Teil der angeborenen Immunabwehr, gehören zu den zytotoxischen Lymphozyten und induzieren die Lyse von veränderten und entarteten Zellen ohne vorausgegangene Sensibilisierung. Die Regulation der NK-Zell-Reaktivität wurde in zwei Hypothesen beschrieben. Dabei besagt die sogenannte „*missing self*“ Hypothese, dass NK Zellen durch das Fehlen von MHC-I Molekülen (MHC-I fungiert hier als inhibitorisches Signal) auf der Oberfläche von entarteten oder infizierten Zellen aktiviert werden und zur Lysierung dieser Zellen führen.³⁴ Am Beispiel der Erythrozyten, die keine MHC-I Moleküle exprimieren aber dennoch nicht lysiert werden, wird deutlich, dass durch diese erste Hypothese die NK-Zell-Reaktivität nicht hinreichend erklärt werden kann. In der „*induced self*“ Hypothese wurde Ende 1990 postuliert, dass zur Aktivierung der NK Zellen zusätzlich die Expression von Stress-induzierten Liganden auf der Oberfläche der Zielzellen nötig ist.³⁶ Die NK-Zell-Reaktivität wird somit durch ein sensibles Gleichgewicht aus aktivierenden und inhibitorischen Signalen gesteuert.²³

Für die Aktivierung der NK Zellen spielt der Fc-Rezeptor eine besondere Rolle. NK Zellen exprimieren nur einen Fc γ R (Fc γ RIIIA, CD16), welcher alleine in der Lage ist, nach Stimulation die Reaktivität der NK Zelle zu induzieren. NK Zellen sind hauptverantwortlich für die Vermittlung der ADCC und werden heutzutage als Effektorzellen für die Immuntherapie genutzt.²⁶ Besonders erfolgreiche, NK Zell-vermittelte Immuntherapiemöglichkeiten sind wie bereits erwähnt in den letzten Jahren in Form von ADCC induzierenden Antikörpern wie beispielsweise Rituximab und Trastuzumab zugelassen worden.^{58,143,144}

Basierend auf den Erkenntnissen, dass die Expression der NKG2DL weitestgehend auf malignen Zellen restringiert ist, wurde ein monospezifisches Fc-optimiertes Immunrezeptor-Ig Fusionsprotein (NKG2D-ADCC) zur Induktion von ADCC durch NK Zellen generiert, wodurch eine deutlich gesteigerte NK Zell-Aktivität und NK Zell-vermittelte Lyse von leukämischen Zellen sowie Zellen solider Tumoren *in vitro* nachgewiesen werden konnte.^{133,134} Aufbauend auf diesen vielversprechenden Ergebnissen sollte versucht werden, durch die Generierung

bispezifischer Fusionsproteine eine im Vergleich zu dem monospezifischen Fusionsprotein nochmals gesteigerte Lyse NKG2DL exprimierender Zielzellen zu erzielen. Außerdem scheinen NK Zellen für maligne hämatopoetische Erkrankungen eine besondere Bedeutung zu haben. So konnte gezeigt werden, dass Leukämiepatienten sowohl eine reduzierte Anzahl als auch eine geringere Aktivität von NK Zellen aufweisen. Auch scheint das Vorhandensein und die Aktivität patienteneigener NK Zellen mit dem Überleben der Leukämiepatienten assoziiert zu sein.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Durch die Entwicklung bispezifischer Fusionsproteine können NK Zellen als Effektorzellen möglicherweise hier noch effektiver sein, als es bisher bereits in anderen Entitäten mit monoklonalen Antikörpern wie Rituximab möglich war.

Darüber hinaus besteht ebenfalls die Möglichkeit, T Zellen als Effektorzellen zu rekrutieren, da auch diese zytotoxische Granula mit Perforin enthalten, über ein höheres Effektorpotential verfügen, und so veränderte oder maligne Zellen lysieren können.^{148,149} Die Idee, T Zellen für die Antikörpertherapie zu rekrutieren, besteht bereits seit vielen Jahren. 2015 wurde mit Blinatumomab (Blinicyto[®]) erstmals ein therapeutischer Antikörper zur Therapie der ALL in der EU zugelassen. Blinatumomab ist ein CD19xCD3 BiTE Antikörper, der zur Rekrutierung und Aktivierung von T Zellen über ihren CD3 T Zell Rezeptor-Komplex führt.⁶⁵ Dieses Beispiel zeigt, dass T Zellen eine geeignete Effektorzellpopulation für die Antikörper-basierte Immuntherapie von malignen hämatopoetischen Erkrankungen darstellen.

Die vorliegende Arbeit handelt von der Generierung und präklinischen Charakterisierung zweier bispezifischer Fusionsproteine zur Immuntherapie der akuten myeloischen Leukämie. Diese bestehen aus der extrazellulären Domäne des Typ-II Transmembranproteins NKG2D, welche mittels eines CH2-Linkers C-terminal an ein CD3 (NKG2D-CD3) bzw. CD16 (NKG2D-CD16) spezifisches Fab-Fragment fusioniert wurde.

Nach der Produktion und Reinigung beider Fusionsproteine wurde zunächst die Spezifität der Konstrukte überprüft. Dabei zeigte sich für beide Konstrukte eine vergleichbar affine und antigen-spezifische Bindung an NKG2DL, unabhängig von den Unterschieden im Effektorteil. Ebenso konnte die Spezifität der NKG2D-CD16 Konstrukte zum Fc-Rezeptor der NK Zellen, sowie die Spezifität der NKG2D-CD3 Konstrukte zum CD3-Rezeptor sowohl auf CD4⁺ als auch auf CD8⁺ T Zellen gezeigt werden. NKG2D bindet verglichen mit anderen Immun-Rezeptor-Liganden-Systemen seine NKG2DL mit einer relativ geringen Affinität zwischen 5×10^{-7} M und 4×10^{-9} M. Weiterhin ist zu beachten, dass NKG2DL aufgrund von Polymorphismen und der Vielfalt an Liganden unterschiedliche Affinitäten zum NKG2D-Rezeptor haben.^{73,81,93,150} Für die generierten Fusionsproteine, die den natürlichen extrazellulären Teil des NKG2D-Rezeptors beinhalten, gilt daher auch diese relativ geringe Affinität auf dem Level der normalen Rezeptor-Liganden-Interaktion. Um zu verhindern, dass diese niedrige Affinität sowie die

angesprochenen Affinitätsunterschiede sich eventuell negativ auf den Therapieerfolg auswirken, könnte es also wichtig sein, das Therapieregime individuell auf jeden Patienten anzupassen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das bispezifische NKG2D-CD16 Konstrukt eine wesentlich höhere Affinität zum Fc-Rezeptor auf NK Zellen aufweist, als die monospezifische Fc-optimierte Variante. Diese saturierten erst bei einer Konzentration von 500 pmol/ml, während NKG2D-CD16 bereits bei einer Konzentration von ca. 100 pmol/ml die Sättigung erreicht. Durch die Verwendung eines gegen den CD16-Rezeptor gerichteten, spezifischen Fab-Fragments wird somit die bereits durch den Aminosäure-Austausch verbesserte Bindung an den Fc-Rezeptor des monospezifischen NKG2D-ADCC nochmals übertroffen. Diese gesteigerte Affinität, zusammen mit der wesentlich spezifischeren Aktivierung der NK Zellen, sollte deshalb auch eine wesentlich potentere NKG2D-CD16 vermittelte Lyse im Vergleich zu NKG2D-ADCC von NKG2DL exprimierenden Zielzellen erreichen. Die gesteigerte, durch NKG2D-CD16 vermittelte Lyse, konnte in Zytotoxizitäts-Assays mittels MICA exprimierenden Transfektanten und allogenen NK Zellen gezeigt werden. Darüber hinaus wäre es wichtig zu analysieren, ob eine gesteigerte Lyse in Gegenwart des NKG2D-CD16 im Vergleich zum NKG2D-ADCC auch gegen primäre AML-Zellen im allogenen sowie im autologen Setting zu beobachten ist. Auch eine Sequenzvariabilität des Fc-Rezeptors der NK Zellen (CD16) kann für die Variabilität mitverantwortlich sein.¹⁵¹ Dieser Polymorphismus der Aminosäuren und seine Bedeutung für die Immuntherapie wird in der Literatur kritisch diskutiert. Für Antikörper wie Rituximab und Trastuzumab gibt es diesbezüglich Arbeiten, die diesem Polymorphismus einen Einfluss auf den Therapieerfolg zuschreiben.¹⁵²⁻¹⁵⁷ Andererseits gibt es Studien, die eine Beeinflussung des Therapieerfolges durch den Polymorphismus verneinen.¹⁵⁸⁻¹⁶² In früheren Versuchen zeigte sich für NKG2D-ADCC im Vergleich zu den schwachen Effekten einer ebenfalls generierten WT-Variante in den meisten Fällen eine sehr deutliche Stimulation der NK Zellen. Lazar *et al.*, die die deutlich gesteigerte Affinität der Antikörper mit SDIE-Modifikation zum Fc γ R11A erstmals zeigen konnten, gelang es ebenfalls, diese Affinitätssteigerung auch bei Fc γ R11A-Molekülen mit Polymorphismus (158V und 158F) nachzuweisen.⁶² Raab *et al.* beschrieben 2014, dass für alle drei Genotypen des V158F-Polymorphismus bei entsprechend hoher, klinisch erreichbarer Dosis, keine relevanten Unterschiede gezeigt werden konnten. Der V158F-Polymorphismus scheint also nur im Falle einer Unterdosierung eine entscheidende Rolle zu spielen.¹³⁴ Die SDIE-ADCC-optimierten Konstrukte binden allerdings ebenfalls mit gesteigerter Affinität den inhibierenden Fc γ R11B. Natürlich befindet sich dieser Rezeptor nicht auf der Oberfläche von NK Zellen. Dennoch zeigt diese ebenfalls erhöhte Affinität, auch wenn diese Bindung im Verhältnis zum Fc γ R11A nur in einer Ratio von 1:4 beschrieben wird⁶², dass die SDIE-ADCC Konstrukte nicht vollständig

selektiv für den Fc γ R111A sind. Eine solche vollständige Selektion auf den aktivierenden Fc γ R111A ist somit nur mit dem bispezifischen Fusionsprotein NKG2D-CD16 zu erwarten.

Mit dem NKG2D-CD3 Konstrukt wurden nach Überprüfung der Spezifität ebenfalls Zytotoxizitäts-Assays durchgeführt, allerdings in einem autologen Versuchsaufbau. Dieser entspricht der realen Situation im Patienten deutlich eher und ermöglicht aufgrund der längeren Versuchsdauer eine reliable Untersuchung der T Zell-Funktion. Um eine ausreichende Anzahl an Effektorzellen zu haben wurden für dieses experimentelle System nur Patienten mit einer moderaten Blastenzahl (30-75%) ausgewählt. Nach dreitägiger Inkubation konnte bei fünf unterschiedlichen unabhängig voneinander behandelten Patientenproben, eine deutliche Reduktion der Leukämiezellzahl beobachtet werden. Die Variabilität der Ergebnisse bezüglich der Reduktion der Tumorzellen lässt sich hierbei mit verschiedenen Faktoren erklären. Zum einen spielt das quantitative Expressionslevel der NKG2DL auf den Tumorzellen des Patienten sicher eine Rolle, welches allerdings nicht immer mit der tatsächlich gemessenen Lyse korrelierte. Darüber hinaus beeinflussen auch die Anzahl an Tumorzellen sowie die Anzahl an funktionellen Leukozyten innerhalb der Patientenprobe die durch das Fusionsprotein vermittelte Lyse. Für einen zum Vergleich in den Versuchen mitgeführten bispezifischen FLT3-CD3 Antikörper, welcher bereits klinisch zum Einsatz kam, konnte eine etwas gesteigerte Lyse der Tumorzellen im Vergleich zu NKG2D-CD3 beobachtet werden. Auch hier könnte ein unterschiedliches Expressionslevel von FLT3 und den NKG2DL auf den Tumorzellen sowie unterschiedliche Affinitäten der beiden Konstrukte zu ihrem jeweiligen Zielmolekül für die unterschiedlichen Lyseraten verantwortlich sein. Für die FLT3 Rezeptor-Liganden-Bindung sind Affinitäten von $0,1 \times 10^{-9}$ bis $0,5 \times 10^{-9}$ M bekannt.¹⁶³ Diese liegt somit deutlich über der Affinität der NKG2D-Rezeptor-Liganden-Interaktion, was entsprechend für die leicht stärkere Lyse der Tumorzellen verantwortlich sein könnte. Derzeit im klinischen Alltag verwendete therapeutische Antikörper wie Rituximab zeigen allerdings nochmal stärkere Affinitäten mit etwa $K_D = 5,2 \times 10^{-9}$ M.¹⁶⁴

NKG2DL besitzen ein hohes Potential zur Aktivierung zytotoxischer Lymphozyten. Daher ist ihre Expression streng reguliert.⁷³ Dennoch konnten auch in gesundem, adulten Gewebe von Niere, Prostata, Uterus, Tonsillen und Lymphknoten ULBP-Transkripte nachgewiesen werden.⁷⁴ Die Expression von Proteinen wurde vor allem intrazellulär in gastrointestinalem Epithel beschrieben.^{82,95} Es konnte allerdings gezeigt werden, dass diese intrazelluläre Expression keine Aktivierung der NK Zellen bedingt. Im Gegensatz dazu können Monozyten beziehungsweise Makrophagen und DCs⁹⁷⁻¹⁰¹ als auch aktivierte T Zellen^{102,103,105,165} NKG2DL auch auf ihrer Oberfläche exprimieren. Die Expression von NKG2DL auf Immunzellen dient allerdings eher der Immunregulation.^{96,106}

Diskutiert werden muss deshalb an dieser Stelle, ob die Expression von NKG2DL auf gesunden, adulten Zellen eine relevante Toxizität beziehungsweise durch das Fusionsprotein getriggerte Autoimmun-Reaktion bei Behandlung mit NKG2D-CD16 oder NKG2D-CD3 auslösen kann. Dafür spielt vor allem die Quantität der Expression von NKG2DL an der Oberfläche eine entscheidende Rolle. Diese ist für NKG2DL auf der Oberfläche gesunder Zellen relativ gering. Sollte es allerdings zu toxischen Wirkungen kommen, werden diese aufgrund der Halbwertszeit der Fusionsproteine nur kurzfristig auftreten. So konnte für ein vergleichbares Fusionsprotein (CTLA-Ig) eine Halbwertszeit von etwa zwei Wochen gezeigt werden.¹⁶⁶ Insgesamt ist daher zu vermuten, dass die Expression von NKG2DL auf gesunden, adulten Zellen für die Therapie mit Fusionsproteinen keine Kontraindikation darstellt.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Arbeit zwei bispezifische, monoklonale Fusionsproteine zur Immuntherapie der AML entwickelt, charakterisiert und ihre Funktionalität im allogenen für NKG2D-CD16 beziehungsweise im autologen Setting für NKG2D-CD3 untersucht. Dabei konnte sowohl in Gegenwart von NKG2D-CD16 sowie von NKG2D-CD3 eine Reduktion der NKG2DL exprimierenden Leukämiezellen beobachtet werden. Inwieweit beide Fusionsproteine geeignete therapeutische Optionen zur Behandlung von AML-Patienten darstellen können, müssen weitere Untersuchungen klären.

6. Literaturverzeichnis

1. Steinbacher J, Baltz-Ghahremanpour K, Schmiedel BJ, Steinle A, Jung G, Kubler A, Andre MC, Grosse-Hovest L, Salih HR. An Fc-optimized NKG2D-immunoglobulin G fusion protein for induction of natural killer cell reactivity against leukemia. *Int J Cancer* 2015; 136:1073-84. doi:10.1002/ijc.29083.
2. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nat Immunol* 2010; 11:785-97.
3. Trouw LA, Daha MR. Role of complement in innate immunity and host defense. *Immunol Lett* 2011; 138:35-7.
4. Ezekowitz RA, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990; 172:1785-94.
5. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.
6. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989; 54 Pt 1:1-13.
7. Underhill DM, Bassetti M, Rudensky A, Aderem A. Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation. *J Exp Med* 1999; 190:1909-14.
8. Herberman RB, Nunn ME, Lavrin DH. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic acid allogeneic tumors. I. Distribution of reactivity and specificity. *Int J Cancer* 1975; 16:216-29.
9. Kiessling R, Klein E, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur J Immunol* 1975; 5:112-7.
10. Di Santo JP. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annu Rev Immunol* 2006; 24:257-86.
11. Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011; 331:44-9.
12. Herberman RB, Holden HT, Ting CC, Lavrin DL, Kirchner H. Cell-mediated immunity to leukemia virus- and tumor-associated antigens in mice. *Cancer Res* 1976; 36:615-21.
13. Kiessling R, Klein E, Pross H, Wigzell H. "Natural" killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *Eur J Immunol* 1975; 5:117-21.
14. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2002; 71:173-83.
15. Smyth MJ, Cretney E, Kelly JM, Westwood JA, Street SE, Yagita H, Takeda K, van Dommelen SL, Degli-Esposti MA, Hayakawa Y. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 2005; 42:501-10.
16. Russell JH, Ley TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:323-70.
17. Moretta L, Bottino C, Pende D, Vitale M, Mingari MC, Moretta A. Human natural killer cells: Molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett* 2005; 100:7-13. doi:10.1016/j.imlet.2005.07.004.
18. Moretta A. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat Rev Immunol* 2002; 2:957-64.
19. Yoon SR, Chung JW, Choi I. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. *Mol Cells* 2007; 24:1-8.
20. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 1990; 76:2421-38.

21. Bancroft GJ. The role of natural killer cells in innate resistance to infection. *Curr Opin Immunol* 1993; 5:503-10.
22. Schariton-Kersten TM, Sher A. Role of natural killer cells in innate resistance to protozoan infections. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:44-51.
23. Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; 23:225-74.
24. Ljunggren HG, Malmberg KJ. Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:329-39.
25. Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:836-48.
26. Vesely MD, Kershaw MH, Schreiber RD, Smyth MJ. Natural innate and adaptive immunity to cancer. *Annu Rev Immunol* 2011; 29:235-71.
27. Brandstadter JD, Yang Y. Natural killer cell responses to viral infection. *J Innate Immun* 2011; 3:274-9.
28. Hayakawa Y, Smyth MJ. Innate immune recognition and suppression of tumors. *Adv Cancer Res* 2006; 95:293-322.
29. Fehniger TA, Cooper MA, Caligiuri MA. Interleukin-2 and interleukin-15: immunotherapy for cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13:169-83.
30. Coca S, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 1997; 79:2320-8.
31. Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 2000; 88:577-83.
32. Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 2000; 356:1795-9.
33. Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ, Jareno J, Zuñil M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 2002; 35:23-8.
34. Karre K, Ljunggren HG, Piontek G, Kiessling R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 1986; 319:675-8.
35. Ljunggren HG, Karre K. In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 1990; 11:237-44.
36. Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 1999; 285:727-9.
37. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; 413:165-71.
38. Raulet DH. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* 2004; 5:996-1002.
39. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 2008; 9:495-502.
40. Bryceson YT, March ME, Ljunggren HG, Long EO. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 2006; 107:159-66.
41. Tonegawa S. Somatic generation of immune diversity. *Biosci Rep* 1988; 8:3-26.
42. Tonegawa S. Antibody and T-cell receptors. *JAMA* 1988; 259:1845-7.
43. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 1983; 302:575-81.
44. Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N. The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Annu Rev Immunol* 1986; 4:529-91. doi:10.1146/annurev.iy.04.040186.002525.
45. Samelson LE, Harford JB, Klausner RD. Identification of the components of the murine T cell antigen receptor complex. *Cell* 1985; 43:223-31.

46. Davodeau F, Peyrat MA, Gaschet J, Hallet MM, Triebel F, Vie H, Kabelitz D, Bonneville M. Surface expression of functional T cell receptor chains formed by interlocus recombination on human T lymphocytes. *J Exp Med* 1994; 180:1685-91.
47. Zinkernagel RM, Doherty PC. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; 251:547-8.
48. Ries LAG HD, Krapcho M, Mariotto A, Miller BA, Feuer EJ, Clegg L, Eisner MP, Horner MJ, Howlader N, Hayat M, Hankey BF, Edwards BK. SEER cancer statistics review, 1975-2003. National Cancer Institute, Bethesda 2006; http://seer.cancer.gov/csr/1975_2003.
49. Orourke AM, Mescher MF. Cytotoxic Lymphocyte-T Activation Involves A Cascade of Signaling and Adhesion Events. *Nature* 1992; 358:253-5.
50. Squier MK, Cohen JJ. Cell-mediated cytotoxic mechanisms. *Curr Opin Immunol* 1994; 6:447-52.
51. Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 1996; 383:787-93.
52. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:715-27.
53. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 1997; 18:89-95.
54. de Baetselier P, Katzav S, Gorelik E, Feldman M, Segal S. Differential expression of H-2 gene products in tumour cells in associated with their metastatogenic properties. *Nature* 1980; 288:179-81.
55. Hui K, Grosveld F, Festenstein H. Rejection of transplantable AKR leukaemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. *Nature* 1984; 311:750-2.
56. Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 1976; 261:705-7.
57. Luznik L, Fuchs EJ. Donor lymphocyte infusions to treat hematologic malignancies in relapse after allogeneic blood or marrow transplantation. *Cancer Control* 2002; 9:123-37.
58. Cartron G, Watier H, Golay J, Solal-Celigny P. From the bench to the bedside: ways to improve rituximab efficacy. *Blood* 2004; 104:2635-42. doi:10.1182/blood-2004-03-1110.
59. Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 1970; 132:211-50.
60. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG. Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human Fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 2002; 277:26733-40. doi:10.1074/jbc.M202069200.
61. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, Meng YG, Rae J, Briggs J, Xie D, Lai J, Stadlen A, Li B, et al. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R. *J Biol Chem* 2001; 276:6591-604.
62. Lazar GA, Dang W, Karki S, Vafa O, Peng JS, Hyun L, Chan C, Chung HS, Eivazi A, Yoder SC, et al. Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:4005-10.
63. Stavenhagen JB, Gorlatov S, Tuailon N, Rankin CT, Li H, Burke S, Huang L, Johnson S, Bonvini E, Koenig S. Fc optimization of therapeutic antibodies enhances their ability to kill tumor cells in vitro and controls tumor expansion in vivo via low-affinity activating fc gamma receptors. *Cancer Research* 2007; 67:8882-90.

64. Moore GL, Chen H, Karki S, Lazar GA. Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions. *MAbs* 2010; 2:181-9.
65. Baeuerle PA, Reinhardt C. Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res* 2009; 69:4941-4. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-0547.
66. Koeffler HP, Golde DW. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 1980; 56:344-50.
67. Giles FJ, Keating A, Goldstone AH, Avivi I, Willman CL, Kantarjian HM. Acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2002:73-110.
68. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* 2016; 127:2391-405. doi:10.1182/blood-2016-03-643544.
69. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, Kantarjian HM, Estey E. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2009; 113:28-36. doi:10.1182/blood-2008-05-157065.
70. Tallman MS. New strategies for the treatment of acute myeloid leukemia including antibodies and other novel agents. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2005:143-50. doi:10.1182/asheducation-2005.1.143.
71. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, Omura GA, Moore JO, McIntyre OR, Frei E, 3rd. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. Cancer and Leukemia Group B. *N Engl J Med* 1994; 331:896-903. doi:10.1056/NEJM199410063311402.
72. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; 115:453-74. doi:10.1182/blood-2009-07-235358.
73. Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:781-90.
74. Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; 14:123-33.
75. Castriconi R, Cantoni C, Della CM, Vitale M, Marcenaro E, Conte R, Biassoni R, Bottino C, Moretta L, Moretta A. Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:4120-5.
76. Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2001; 2:255-60.
77. Long EO. Versatile signaling through NKG2D. *Nature Immunology* 2002; 3:1119-20.
78. Zhang T, Barber A, Sentman CL. Chimeric NKG2D modified T cells inhibit systemic T-cell lymphoma growth in a manner involving multiple cytokines and cytotoxic pathways. *Cancer Res* 2007; 67:11029-36.
79. Friese MA, Wischhusen J, Wick W, Weiler M, Eisele G, Steinle A, Weller M. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antitumor immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 2004; 64:7596-603.
80. Burgess SJ, Maasho K, Masilamani M, Narayanan S, Borrego F, Coligan JE. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunologic Research* 2008; 40:18-34.
81. Champsaur M, Lanier LL. Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses. *Immunol Rev* 2010; 235:267-85.

82. Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:12445-50.
83. Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 1998; 279:1737-40.
84. Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436:1186-90.
85. Raulet DH, Gasser S, Gowen BG, Deng WW, Jung HY. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annual Review of Immunology*, Vol 31 2013; 31:413-41.
86. Eagle RA, Trowsdale J. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* 2007; 7:737-44.
87. Diefenbach A, Tomasello E, Lucas M, Jamieson AM, Hsia JK, Vivier E, Raulet DH. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 2002; 3:1142-9.
88. Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 2000; 12:721-7.
89. Carayannopoulos LN, Naidenko OV, Fremont DH, Yokoyama WM. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 2002; 169:4079-83.
90. Strong RK, McFarland BJ. NKG2D and related immunoreceptors. *Cell Surface Receptors* 2004; 68:281-+.
91. Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Strong RK, Spies T. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 2001; 53:279-87.
92. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389-96.
93. Nausch N, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 2008; 27:5944-58.
94. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2006; 291:L222-L31.
95. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang SL, Cellier C, Schmitz J, Verkarre V, Fodil N, Bahram S, Cerf-Bensussan N, et al. A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 2004; 21:367-77.
96. Eagle RA, Jafferji I, Barrow AD. Beyond Stressed Self: Evidence for NKG2D Ligand Expression on Healthy Cells. *Curr Immunol Rev* 2009; 5:22-34.
97. Jinushi M, Takehara T, Kanto T, Tatsumi T, Groh V, Spies T, Miyagi T, Suzuki T, Sasaki Y, Hayashi N. Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2003; 170:1249-56.
98. Hamerman JA, Ogasawara K, Lanier LL. Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* 2004; 172:2001-5.
99. Ebihara T, Masuda H, Akazawa T, Shingai M, Kikuta H, Ariga T, Matsumoto M, Seya T. Induction of NKG2D ligands on human dendritic cells by TLR ligand stimulation and RNA virus infection. *Int Immunol* 2007; 19:1145-55.
100. Nedvetzki S, Sowinski S, Eagle RA, Harris J, Vely F, Pende D, Trowsdale J, Vivier E, Gordon S, Davis DM. Reciprocal regulation of human natural killer cells and macrophages associated with distinct immune synapses. *Blood* 2007; 109:3776-85.
101. Kloss M, Decker P, Baltz KM, Baessler T, Jung G, Rammensee HG, Steinle A, Krusch M, Salih HR. Interaction of monocytes with NK cells upon Toll-like receptor-induced expression of the NKG2D ligand MICA. *J Immunol* 2008; 181:6711-9.

102. Molinero LL, Fuertes MB, Fainboim L, Rabinovich GA, Zwirner NW. Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *Journal of Leukocyte Biology* 2003; 73:815-22.
103. Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW. NF- κ B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *Journal of Immunology* 2004; 173:5583-90.
104. Liu G, Atteridge CL, Wang XJ, Lundgren AD, Wu JD. Cutting Edge: The Membrane Type Matrix Metalloproteinase MMP14 Mediates Constitutive Shedding of MHC Class I Chain-Related Molecule A Independent of A Disintegrin and Metalloproteinases. *Journal of Immunology* 2010; 184:3346-50.
105. Molinero LL, Domaica CI, Fuertes MB, Girart MV, Rossi LE, Zwirner NW. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Human Immunology* 2006; 67:170-82.
106. Cerboni C, Zingoni A, Cipitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK-cell lysis. *Blood* 2007; 110:606-15.
107. Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* 2008; 28:571-80.
108. Ljunggren HG. Cancer immunosurveillance: NKG2D breaks cover. *Immunity* 2008; 28:492-4.
109. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; 419:734-8. doi:10.1038/nature01112.
110. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169:4098-102.
111. Salih HR, Goehlsdorf D, Steinle A. Release of MICB molecules by tumor cells: mechanism and soluble MICB in sera of cancer patients. *Hum Immunol* 2006; 67:188-95.
112. Bacon L, Eagle RA, Meyer M, Easom N, Young NT, Trowsdale J. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J Immunol* 2004; 173:1078-84.
113. Sconocchia G, Lau M, Provenzano M, Rezvani K, Wongsena W, Fujiwara H, Hensel N, Melenhorst J, Li JM, Ferrone S, et al. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. *Blood* 2005; 106:3666-72.
114. Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* 2007; 282:18922-8.
115. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Rammensee HG, Steinle A. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68:6368-76. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6768.
116. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; 180:7249-58.
117. Boutet P, Agura-Gonzalez S, Atkinson S, Pennington CJ, Edwards DR, Murphy G, Reyburn HT, Vales-Gomez M. Cutting Edge: The Metalloproteinase ADAM17/TNF- α -Converting Enzyme Regulates Proteolytic Shedding of the MHC Class I-Related Chain B Protein. *Journal of Immunology* 2009; 182:49-53.
118. Ashiru O, Boutet P, Fernandez-Messina L, Aguera-Gonzalez S, Skepper JN, Vales-Gomez M, Reyburn HT. Natural Killer Cell Cytotoxicity Is Suppressed by Exposure to the Human NKG2D Ligand MICA*008 That Is Shed by Tumor Cells in Exosomes. *Cancer Research* 2010; 70:481-9.

119. Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and Oxidative Stress Causes Enhanced Release of NKG2D Ligand-Bearing Immunosuppressive Exosomes in Leukemia/Lymphoma T and B Cells. *Plos One* 2011; 6.
120. Salih HR, Holdenrieder S, Steinle A. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci* 2008; 13:3448-56.
121. Poggi A, Catellani S, Garuti A, Pierri I, Gobbi M, Zocchi MR. Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia* 2009; 23:641-8.
122. Boissel N, Rea D, Tieng V, Dulphy N, Brun M, Cayuela JM, Rousselot P, Tamouza R, Le Bouteiller P, Mahon FX, et al. BCR/ABL oncogene directly controls MHC class I chain-related molecule A expression in chronic myelogenous leukemia. *J Immunol* 2006; 176:5108-16.
123. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66:2520-6.
124. Diermayr S, Himmelreich H, Durovic B, Mathys-Schneeberger A, Siegler U, Langenkamp U, Hofsteenge J, Gratwohl A, Tichelli A, Paluszewska M, et al. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood* 2008; 111:1428-36.
125. Nuckel H, Switala M, Sellmann L, Horn PA, Durig J, Duhrsen U, Kueppers R, Grosse-Wilde H, Rebmann V. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010; 24:1152-9.
126. Fernandez-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Aguera-Gonzalez S, Skepper JN, Reyburn HT, Vales-Gomez M. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010; 285:8543-51.
127. Wiemann K, Mittrucker HW, Feger U, Welte SA, Yokoyama WM, Spies T, Rammensee HG, Steinle A. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 2005; 175:720-9.
128. Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 2006; 239:22-30.
129. Cerboni C, Ardolino M, Santoni A, Zingoni A. Detuning CD8(+) T lymphocytes by down-regulation of the activating receptor NKG2D: role of NKG2D ligands released by activated T cells. *Blood* 2009; 113:2955-64.
130. Ma L, Li G, Su Y, He Q, Zhang C, Zhang J. The soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein reduced NKG2D expression on natural killer and T cells from patients with prolactinoma and non-secreting pituitary adenoma. *J Clin Neurosci* 2010; 17:241-7.
131. Della CM, Carlomagno S, Frumento G, Balsamo M, Cantoni C, Conte R, Moretta L, Moretta A, Vitale M. The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKp46- and NKG2D-activating receptors and regulates NK-cell function. *Blood* 2006; 108:4118-25.
132. Crane CA, Han SJ, Barry JJ, Ahn BJ, Lanier LL, Parsa AT. TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8(+) T cells glioma patients. *Neuro-Oncology* 2010; 12:7-13.
133. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grunebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Salih HR. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* 2012; 189:1360-71.
134. Raab S, Steinbacher J, Schmiedel BJ, Kousis PC, Steinle A, Jung G, Grosse-Hovest L, Salih HR. Fc-Optimized NKG2D-Fc Constructs Induce NK Cell Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity against Breast Cancer Cells Independently of HER2/neu Expression Status. *Journal of Immunology* 2014; 193:4261-72.

135. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 2004; 21:137-48.
136. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144:646-74.
137. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000; 6:443-6.
138. Gennari R, Menard S, Fagnoni F, Ponchio L, Scelsi M, Tagliabue E, Castiglioni F, Villani L, Magalotti C, Gibelli N, et al. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:5650-5.
139. Liljefors M, Nilsson B, Skog ALH, Ragnhammar P, Mellstedt H, Frodin JE. Natural killer (NK) cell function is a strong prognostic factor in colorectal carcinoma patients treated with the monoclonal antibody 17-1A. *International Journal of Cancer* 2003; 105:717-23.
140. Niwa R, Hatanaka S, Shoji-Hosaka E, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Yokoi H, Nakamura K, Shitara K. Enhancement of the antibody-dependent cellular cytotoxicity of low-fucose IgG1 is independent of Fc gamma RIIIa functional polymorphism. *Clinical Cancer Research* 2004; 10:6248-55.
141. Niwa R, Sakurada M, Kobayashi Y, Uehara A, Matsushima K, Ueda R, Nakamura K, Shitara K. Enhanced natural killer cell binding and activation by low-fucose IgG1 antibody results in potent antibody-dependent cellular cytotoxicity induction at lower antigen density. *Clinical Cancer Research* 2005; 11:2327-36.
142. Rogers KA, Jones JA. Obinutuzumab for the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Drugs Today (Barc)* 2014; 50:407-19. doi:10.1358/dot.2014.50.6.2138702.
143. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008; 9:503-10.
144. Seidel UJ, Schlegel P, Lang P. Natural killer cell mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity in tumor immunotherapy with therapeutic antibodies. *Front Immunol* 2013; 4:76.
145. Lowdell MW, Craston R, Samuel D, Wood ME, O'Neill E, Saha V, Prentice HG. Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br J Haematol* 2002; 117:821-7.
146. Tajima F, Kawatani T, Endo A, Kawasaki H. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia* 1996; 10:478-82.
147. Pierson BA, Miller JS. CD56+bright and CD56+dim natural killer cells in patients with chronic myelogenous leukemia progressively decrease in number, respond less to stimuli that recruit clonogenic natural killer cells, and exhibit decreased proliferation on a per cell basis. *Blood* 1996; 88:2279-87.
148. Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, Podack ER, Zinkernagel RM, Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369:31-7. doi:10.1038/369031a0.
149. Chiang SC, Theorell J, Entesarian M, Meeths M, Mastafa M, Al-Herz W, Frisk P, Gilmour KC, Ifversen M, Langenskiold C, et al. Comparison of primary human cytotoxic T-cell and natural killer cell responses reveal similar molecular requirements for lytic granule exocytosis but differences in cytokine production. *Blood* 2013; 121:1345-56. doi:10.1182/blood-2012-07-442558.
150. Mistry AR, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 2007; 121:439-47. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x.
151. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc gamma RIIIa gene. *Blood* 2002; 99:754-8.
152. Anolik JH, Campbell D, Felgar RE, Young F, Sanz I, Rosenblatt J, Looney RJ. The relationship of Fc gamma RIIIa genotype to degree of B cell depletion by rituximab in the treatment of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 2003; 48:455-9.

153. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 2003; 21:3940-7.
154. Treon SP, Hansen M, Branagan AR, Verselis S, Emmanouilides C, Kimby E, Frankel SR, Touroutoglou N, Turnbull B, Anderson KC, et al. Polymorphisms in Fc gamma RIIIA (CD 16) receptor expression are associated with clinical response to rituximab in Waldenstrom's macroglobulinemia. *Journal of Clinical Oncology* 2005; 23:474-81.
155. Persky DO, Dornan D, Goldman BH, Braziel RM, Fisher RI, LeBlanc M, Maloney DG, Press OW, Miller TP, Rimsza LM. Fc gamma receptor 3a genotype predicts overall survival in follicular lymphoma patients treated on SWOG trials with combined monoclonal antibody plus chemotherapy but not chemotherapy alone. *Haematologica-the Hematology Journal* 2012; 97:937-42.
156. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G, Laccabue D, Zerbini A, Camisa R, Bisagni G, et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2008; 26:1789-96.
157. Carlotti E, Salmoiraghi S, Palumbo GA, Oldani E, Tibullo D, Rossi A, Golay J, Pulsoni A, Foa R, Rambaldi A. Fc alpha RIIIA and Fc Gamma RIIA polymorphisms do not predict the clinical outcome of follicular non Hodgkin's lymphoma patients treated with sequential CHOP and Rituximab. *Haematologica-the Hematology Journal* 2007; 92:49.
158. Dornan D, Spleiss O, Yeh RF, Duchateau-Nguyen G, Dufour A, Zhi JG, Robak T, Moiseev SI, Dmoszynska A, Solal-Celigny P, et al. Effect of FCGR2A and FCGR3A variants on CLL outcome. *Blood* 2010; 116:4212-22.
159. Prochazka V, Papajik T, Gazdova J, Divoka M, Rozmanova S, Faber E, Raida L, Kucerova L, Langova K, Jarosova M, et al. Fc gamma RIIIA receptor genotype does not influence an outcome in patients with follicular lymphoma treated with risk-adapted immunochemotherapy. *Neoplasma* 2011; 58:263-70.
160. Ghesquieres H, Cartron G, Seymour JF, Delfau-Larue MH, Offner F, Soubeyran P, Perrot A, Brice P, Bouabdallah R, Sonet A, et al. Clinical outcome of patients with follicular lymphoma receiving chemoimmunotherapy in the PRIMA study is not affected by FCGR3A and FCGR2A polymorphisms. *Blood* 2012; 120:2650-7.
161. Hurvitz SA, Betting DJ, Stem HM, Quinaux E, Stinson J, Seshagiri S, Zhao Y, Buyse M, Mackey J, Driga A, et al. Analysis of Fc gamma Receptor IIIa and IIa Polymorphisms: Lack of Correlation with Outcome in Trastuzumab-Treated Breast Cancer Patients. *Clinical Cancer Research* 2012; 18:3478-86.
162. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* 2008; 112:4793-807.
163. Turner AM, Lin NL, Issarachai S, Lyman SD, Broudy VC. FLT3 receptor expression on the surface of normal and malignant human hematopoietic cells. *Blood* 1996; 88:3383-90.
164. Smith MR. Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene* 2003; 22:7359-68. doi:10.1038/sj.onc.1206939.
165. Maasho K, Opoku-Anane J, Marusina AI, Coligan JE, Borrego F. Cutting edge: NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8(+) T cells. *Journal of Immunology* 2005; 174:4480-4.
166. Ma Y, Lin BR, Lin B, Hou S, Qian WZ, Li J, Tan M, Ma J, Li BH, Wang H, et al. Pharmacokinetics of CTLA4Ig fusion protein in healthy volunteers and patients with rheumatoid arthritis. *Acta Pharmacologica Sinica* 2009; 30:364-71.

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ADCC	<i>antibody dependent cellular cytotoxicity</i>
ADCP	<i>antibody dependent cellular phagocytosis</i>
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BSA	Bovines Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GvL	<i>graft-versus-leukemia</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

i.v.	intravenös
KM	Knochenmark
L	Liter
mAb	Monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
NEAA	Nicht-essentielle Aminosäure (<i>non-essential amino acid</i>)
NKG2D	<i>natural killer group 2 member D</i>
NKG2DL	NKG2D Ligand
NK Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
P/S	Penicillin/Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SFI	Spezifischer Fluoreszenz-Index
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TSZ	Tumorstammzellen
ÜN	Über Nacht
μ l	Mikroliter
7-AAD	7-Amino-Actinomycin

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Komponenten des Immunsystems.....	3
Abbildung 2: WHO-Klassifikation der AML. ⁶⁸	11
Abbildung 3: Aufbau der NKG2D-Fusionsproteine.....	30
Abbildung 4: Bindung der NKG2D-Fusionsproteine an MICA-Transfektanten.	31
Abbildung 5: Spezifität des NKG2D-CD16 Fusionsproteins.....	32
Abbildung 6: Spezifität des NKG2D-CD3 Fusionsproteins.....	33
Abbildung 7: Dosistitration des NKG2D-ADCC im Vergleich zu NKG2D-CD16 auf pNKC. ...	34
Abbildung 8: Modulation der NK-Zell-Zytotoxizität durch die NKG2D-Fusionsproteine gegen MICA-Transfektanten.	35
Abbildung 9: Expression der NKG2DL sowie FLT3 auf der Oberfläche der Leukämiezellen eines AML-Patienten.	36
Abbildung 10: Einfluss von NKG2D-CD3 auf die Lyse von AML-Zellen durch autologe T Zellen eines AML-Patienten.	37
Abbildung 11: Aktivierung der zytotoxischen T Zellen (CD8+, oben) sowie der T Helfer-Zellen (CD4+, unten) mittels des Aktivierungsmarkers CD25 im autologen Setting.....	38
Abbildung 12: Einfluss von NKG2D-CD3 auf die Lyse von AML-Zellen durch autologe T Zellen.	39

7.3. Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Diese Arbeit wurde in der „Klinischen Kooperationseinheit Translationale Immunologie“ des Deutschen Konsortiums für Translationale Krebsforschung (DKTK) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) am Partnerstandort Tübingen unter Betreuung von Prof. Dr. Helmut R. Salih durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Prof. Dr. Helmut R. Salih.

Mit Ausnahme der im Folgenden aufgezählten Versuche wurden alle Versuche, die zur Entstehung der gezeigten Abbildungen führten, nach Einarbeitung durch Herrn Dr. rer. nat. Samuel Körner, eigenständig von mir durchgeführt.

Herr Dr. rer. nat. Samuel Körner hat zu folgenden Abbildungen beigetragen:

Abbildung 3: Aufbau der NKG2D-Fusionsproteine.....	30
Abbildung 6: Dosistitration des NKG2D-ADCC im Vergleich zu NKG2D-CD16 auf pNKC....	33
Abbildung 7: Modulation der NK Zell Zytotoxizität durch die NKG2D-Fusionsproteine gegen MICA-Transfektanten.....	34

Die statistische Auswertung erfolgte nach der Einarbeitung durch Herrn Dr. rer. nat. Samuel Körner eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

[Unterschrift]

7.4. Danksagung

Herrn Professor Dr. Helmut R. Salih danke ich für die Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe arbeiten und promovieren zu dürfen, für die Bereitstellung aller Arbeitsmaterialien, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und für die Ermöglichung dieser Arbeit. Nicht nur auf fachlicher Ebene durfte ich unter Ihrer Führung in dieser Zeit unheimlich viel lernen.

Ein großes Dankeschön gilt Herrn Dr. rer. nat. Samuel Körner für die Einarbeitung und seine aufopfernde Betreuung während und auch nach der Zeit im Labor sowie beim Verfassen dieser Dissertation. Danke für deine Unterstützung und Mühe, Samu!

Steffi, auch dir möchte ich ganz besonders danken für die Unterstützung und Beratung während und vor allem nach der Zeit im Labor und die Freundschaft die daraus entstanden ist.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Kollegen für das meist tolle Klima und die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken. Vielen Dank an Basti, Claudia, Daniela, Ilona, Julia, Katrin, Melli, Phil und Tina.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund, Kommilitonen und Kollegen Jonas Schmidt. Danke für diese grandiose Zeit in der wir uns gegenseitig vor dem Wahnsinn bewahrt haben und unheimlich viel Spaß zusammen hatten.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freunden, die mich jeder Zeit durch alle Hochs und Tiefs begleitet, unterstützt und motiviert haben. Maren, Lukas und Philipp, auf euren Rückhalt konnte ich jeder Zeit bauen. Vielen, vielen Dank dafür.

Juliane, du hast mich immer wieder angetrieben und motiviert weiter zu schreiben und diese Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss zu bringen. Vielen Dank für deine ständige Unterstützung und dein Verständnis während dieser intensiven Zeit.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, meinen Großeltern, meiner Schwester Isabel und meiner Mama, die mich unermüdlich durch diese entbehrungsreiche Zeit immerzu aufmunternd und anspornend getragen hat. Ihr seid mir unheimlich wichtig und erst euer Rückhalt und das Vertrauen auf unsere Familie haben diese Arbeit möglich gemacht. Dafür werde ich euch immer dankbar sein.

Papa, diese Arbeit ist auch für dich!