

GENERIERUNG UND EVALUATION VON MODIFIZIERTEN
NK-ZELLEN MIT SDF-1ALPHA-CHEMOTAXIS UND
REAKTIVITÄT GEGEN EGFR_{vIII}-POSITIVE GLIOMZELLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

eingereicht am 09. April 2014 an der

Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften
der Technischen Universität Dresden

von

Dipl. Biol. Nadja Müller
geboren am 26. Juni 1984 in Dresden

Gutachter:

Prof. Dr. Hanns Achim Temme
Prof. Dr. Günter Vollmer

Die Dissertation wurde in der Zeit von Juli 2009 bis März 2014 in der Sektion „Experimentelle Neurochirurgie und Tumorimmunologie“ am Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden angefertigt und am 16.07.2014 an der TU Dresden verteidigt.

DANKSAGUNG

Ohne die Hilfe vieler Menschen wäre diese Arbeit nicht zu bewerkstelligen gewesen. An dieser Stelle dafür ein herzliches Dankeschön!

Ich möchte als erstes meinem Doktorvater, Prof. Dr. Achim Temme danken, dass ich meine Dissertation in Deiner Arbeitsgruppe anfertigen und dieses interessante Thema bearbeiten durfte. Danke für die Betreuung meiner Arbeit, Deine hilfreichen Ideen und Ratschläge sowie stets wohlwollende Diskussionsbereitschaft.

Ein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Günter Vollmer (Institut für Zoologie, TU Dresden) für das Interesse an meiner Arbeit und die Bereitschaft, die vorliegende Dissertation zu begutachten.

Danke all denen, die mir – an entsprechender Stelle genannt – für meine Arbeit großzügig Zellen, Expressionsplasmide oder Antikörper überlassen haben: Prof. Dr. Dirk Lindemann (Institut für Virologie, TU Dresden), Dr. Sebastian Brenner (Kinderklinik, Carl Gustav Carus Universitätsklinikum der TU Dresden), Dr. Marc Cartellieri (Institut für Immunologie, TU Dresden), Dr. Alexander Schulte und Dr. Katrin Lamszus (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf), Dr. Ira Pastan und Dr. Frank Furnari (La Jolla University, California, USA).

Dr. Rebekka Wehner und Dr. Marc Cartellieri danke ich für Eure wertvollen Anregungen und die Unterstützung bei INF γ - und Chromfreisetzungs-Assays. Bei Dr. Monika Füssel (DKMS Dresden) bedanke ich mich für die HLA-Typisierung der verwendeten Zellen.

Natürlich verdienen auch alle meinen Kollegen und Freunde an der Uniklinik meinen Dank. Über die letzten fünf Jahre haben wir die Höhen und Tiefen des Laboralltags durchlebt und als Team so viele Erlebnisse geteilt, die diese Zeit für mich wirklich wertvoll gemacht haben. Meiner liebsten Mittagsrunde muss ich an dieser Stelle nicht sagen, dass Ihr mir manchen Tag gerettet habt. Für alles ein riesiges Danke und das obligatorische Simpsons-Zitat: „Ich hoffe mein Schaden hat kein Gehirn genommen!“ Ihr werdet mir fehlen!

Ich kann es nicht oft genug wiederholen: Ohne die Liebe und Unterstützung meiner Familie, die immer an meiner Seite steht und an mich glaubt, wäre all das nicht möglich gewesen! Auch meine Freunde waren immens wichtig für das Gelingen dieser Arbeit. Es tut gut zu wissen, dass Ihr für mich da seid und dass ihr meinen oft genug völlig unverständlichen Wissenschafts-Slang in den letzten Jahren ertragen habt. Danke dafür von ganzem Herzen!

Und Du, Robert, weißt, dass Du der wichtigste Mensch in meinem Leben bist. Danke für Deine Liebe, Deine Geduld, Dein Vertrauen und dafür, dass Du mir immer das Gefühl gibst, mit Dir gemeinsam auf dem richtigen Weg zu sein.

ZUSAMMENFASSUNG

Bei klassischen Therapien von Krebserkrankungen kehrt der Tumor oft nach einiger Zeit wieder, da die operative Entfernung nicht immer alle Krebszellen eliminiert und Chemo- und Strahlentherapien nicht selektiv ausschließlich Krebszellen angreifen. Das Interesse der Forschung für innovative Krebstherapien richtet sich daher immer mehr auf die Erhöhung der Selektivität und die Eliminierung von Mikrometastasen, um die Überlebensdauer der Patienten zu verlängern. Hierfür zeigten verschiedene Untersuchungen in den letzten Jahren die Eignung von Immuntherapien. Neben T-Zellen rücken dabei Natürliche Killerzellen als Effektorzellen für eine adjuvante Immuntherapie von Krebserkrankungen immer mehr in den Fokus. Sie verfügen im Gegensatz zu zytotoxischen T-Zellen über das Potential, nicht nur tumorassoziierte Antigene sondern auch MHC Klasse I-negative Tumorzellen erkennen und lysieren zu können. Durch ihre antitumoralen Eigenschaften, aber auch den nachweislich sicheren klinischen Einsatz, scheinen sie sich besonders für die Bekämpfung von malignen Zellen anzubieten. NK-Zellen können *ex vivo* aktiviert und gentechnisch in ihrer Effektorfunktion optimiert werden. Die Armierung mit einem chimären Antigenrezeptor (CAR) kann sie zu Tumorzellen umlenken, die sich sonst einer Immunerkennung entziehen. Durch den chimären Antigenrezeptor wird ihr großes zytotoxisches Potential mit den Vorzügen der Antigenerkennung durch einen hochaffinen Antikörper kombiniert. Der Erfolg der Immuntherapie basiert jedoch nicht ausschließlich auf einer spezifischen Antigenerkennung, sondern auch auf einer effizienten Migration hin zum Tumor. Sowohl T- als auch Natürliche Killerzellen können aus Blutgefäßen extravasieren und zu entzündlichen Geweben und Tumoren migrieren. Wird jedoch neben der umgelenkten Zytotoxizität ihr Migrationsverhalten verbessert, indem sie zusätzlich mit einem Rezeptor für ein von Tumoren sekretiertes Chemokin ausgestattet werden, könnte dies einen wirkungsvollen Ansatz zur Optimierung einer Immuntherapie darstellen.

Da Immunzellen unter bestimmten Bedingungen auch durch die Blut-Hirn-Schranke gelangen, erscheint der Einsatz von Immunzellen für Hirntumore sinnvoll. Vor allem das Glioblastoma multiforme ist mit konventionellen Therapieformen nicht heilbar. Trotz intensiver Behandlungsmethoden beträgt die mittlere Überlebenszeit für Patienten mit primärem Glioblastom nicht mehr als 14,6 Monate. Gerade bei Hirntumoren ist die großzügige operative Entfernung des Tumors und des umliegenden Gewebes nicht möglich, so dass häufig einzelne Tumorzellen zurück bleiben. Eine adjuvante Immuntherapie mit NK-Zellen soll diese verbleibenden Zellen finden und eliminieren. Als Zielantigen wurde hierfür das ausschließlich auf Tumorzellen gefundene und von primären Gliomen häufig überexprimierte tumorassoziierte Antigen EGFRvIII gewählt. Da Gliome zudem häufig das Chemokin SDF-1 α sekretieren, hatte die vorliegende Arbeit die Kombination eines CXCR4-Chemokinrezeptors mit einem gegen EGFRvIII gerichteten chimären Antigenrezeptor zum Ziel. Dieser verknüpft das durch aktivierende NK-Zell-Rezeptoren rekrutierte DNAX-

activation protein 12 (DAP12) mit dem hochaffinen α -EGFRvIII-Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1) und soll so zytotoxische Effektormechanismen der NK-Zellen spezifizieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die permanente NK-Zelllinie YTS und primäre humane NK-Zellen gesunder Spender durch lentiviralen Gentransfer mit den beschriebenen Rezeptorkonstrukten modifiziert. Neben der korrekten Translation wurden eine starke und über lange Zeiträume stabile Oberflächenexpression sowie die Funktionalität der eingebrachten Rezeptoren *in vitro* nachgewiesen. Der Chemokinrezeptor verbesserte die SDF-1 α -abhängige Migration von NK-Zellen signifikant. Der α -EGFRvIII-DAP12 Rezeptor vermittelte eine spezifische und effiziente Aktivierung der NK-Zellen. Die Bindung des Rezeptors an EGFRvIII führte zur Phosphorylierung der ITAM-Sequenz der DAP12-Signaluntereinheit und zur Rekrutierung der Tyrosinkinase ZAP70. Dadurch wurde eine aktivierende Signalkaskade initiiert und zytotoxische Granula sowie inflammatorische Zytokine wie INF γ freigesetzt. Die Aktivierung dieser Effektormechanismen vermittelte den armierten NK-Zellen eine spezifische Zytotoxizität gegenüber MHC Klasse I-positiven und EGFRvIII-positiven Tumorzellen. Auch im Tiermodell wurden die verbesserte Migration und die antitumorale Aktivität derartig modifizierter NK-Zellen gezeigt. Die selektive antitumorale Wirkung des α -EGFRvIII-DAP12 CAR sowie die CXCR4-vermittelte Migration einer modifizierten permanenten NK-Zelllinie wurde *in vivo* mit Hilfe von Tumor-Xenograft-Mausmodellen gezeigt. Die kombinierte Expression des α -EGFRvIII-DAP12 CAR mit dem CXCR4-Chemokinrezeptor führte *in vivo* zu einer spezifischen Chemotaxis hin zu subkutan etablierten, SDF-1 α sekretierenden und EGFRvIII-positiven Glioblastomzellen. Dort konnten die NK-Zellen ihr verbessertes zytotoxisches Potential entfalten und die Tumore effizient und dauerhaft eliminieren.

Die vorliegende Arbeit zeigt die Generierung und Evaluation von Natürlichen Killerzellen, die EGFRvIII-positive und SDF-1 α sekretierende Glioblastomzellen erkennen und effizient abtöten können. Die Kombination der gelenkten Zytotoxizität mit einer optimierten Migration von Immuneffektorzellen erscheint auf Grundlage der hier gewonnenen Daten als ein vielversprechender Ansatz zur zukünftigen Therapie des primären Glioblastoms.

INHALTSVERZEICHNIS

Danksagung.....	1
Zusammenfassung.....	2
Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	10
1.1 Gliome	10
1.1.1 Charakteristik.....	10
1.1.2 Evasionsstrategien	11
1.2 Adjuvante Immuntherapie von Tumorerkrankungen	11
1.3 Natürliche Killerzellen.....	13
1.3.1 Phänotyp.....	13
1.3.2 Wirkungsweise	13
1.4 Vor- und Nachteile von auf NK-Zellen basierenden immuntherapeutischen Ansätzen	16
1.5 Klinische Studien mit NK-Zellen	18
1.6 NK-Zellen und Hirntumore.....	18
1.7 Immuntherapie von Glioblastoma multiforme mit genetisch modifizierten zytotoxischen Zellen.....	19
1.7.1 Der EGFRvIII als Ziel einer gelenkten Zytotoxizität	20
1.7.1.1 Der EGFRvIII als Oberflächenmarker für Glioblastoma multiforme	20
1.7.1.2 Chimäre Antigenrezeptoren als Mediatoren einer gerichteten Immuntherapie	22
1.7.2 Die CXCR4-SDF-1 α -Achse als Ziel einer verbesserten Migration	24
1.7.2.1 SDF-1 α als chemotaktischer Marker für Glioblastoma multiforme.....	24
1.7.2.2 SDF-1 α als Ziel einer gerichteten Immuntherapie.....	24
1.8 Zielsetzung und Fragestellungen	26
2 Material und Methoden	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Antibiotika	29
2.1.2 Antikörper	29
2.1.3 Bakterienstämme.....	32
2.1.4 Chemikalien.....	32
2.1.5 Enzyme.....	34
2.1.6 Größenstandards	34

2.1.7	Inhibitoren.....	34
2.1.8	Kommerzielle Kits	35
2.1.9	Lösungen und Puffer	36
2.1.10	Medien.....	38
2.1.11	Oligonukleotide	40
2.1.12	Plasmide	41
2.1.13	Software.....	43
2.1.14	Verbrauchsmittel	43
2.1.15	Zelllinien.....	44
2.2	Mikrobiologische Methoden	45
2.2.1	Anzucht von Bakterien	45
2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien	45
2.2.3	Transformation von Bakterien.....	46
2.2.4	Blau-Weiß-Selektion.....	46
2.2.5	Plasmid-DNA-Präparation	46
2.2.5.1	Mini-DNA-Präparation.....	46
2.2.5.2	Midi-DNA-Präparation.....	47
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	47
2.3.1	Klonierung	47
2.3.1.1	Enzymatischer Restriktionsverdau	47
2.3.1.2	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten	48
2.3.1.3	Agarosegelelektrophorese	48
2.3.1.4	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
2.3.1.5	Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren.....	49
2.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren am Photometer.....	50
2.3.3	DNA-Sequenzierung	50
2.3.4	DNA-Isolation.....	50
2.3.5	RNA-Isolation	50
2.3.6	cDNA-Synthese	51
2.3.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
2.3.8	ELISA.....	53
2.4	Proteinbiochemische Methoden	54

2.4.1	Aufreinigung sekretierter Antikörper aus Zellkulturüberständen	54
2.4.1.1	Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Säulchen	54
2.4.1.2	Dialyse	54
2.4.2	Milde Lyse	54
2.4.3	Proteinbestimmung	55
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	55
2.4.5	Der „Semidry“-Western Blot von Proteinen auf PVDF-Membranen	56
2.4.6	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen	56
2.4.7	„Stripping“ von PVDF-Membranen	57
2.5	Zellbiologische Methoden	57
2.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	57
2.5.1.1	Bestimmung der Lebendzellzahl	58
2.5.1.2	Isolation von primären humanen NK-Zellen aus peripherem Blut	58
2.5.1.3	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zelllinien	59
2.5.2	Transiente Transfektion mit Polyethylenimin	59
2.5.3	Generierung von lentiviralen Zellkulturüberständen	60
2.5.4	Stabile Transduktion	61
2.5.4.1	Transduktion von Zelllinien	61
2.5.4.2	Transduktion von primären humanen NK-Zellen	61
2.5.4.3	Virusiterbestimmung und Berechnung der „multiplicity of infection“	62
2.5.5	Durchflusszytometrie	62
2.5.5.1	Oberflächenfärbung mit Antikörpern	63
2.5.5.2	Intrazelluläre Antikörperfärbungen	63
2.5.6	Bestimmung des klonalen Überlebens von Langzeitzellkulturen	63
2.5.7	Überprüfung des Migrationsverhaltens <i>in vitro</i> : Der Boyden-Kammer-Assay	64
2.5.8	Überprüfung des zytotoxischen Potentials <i>in vitro</i>	65
2.5.8.1	ZAP70-Phosphorylierung	65
2.5.8.2	Degranulation	66
2.5.8.3	INF γ -Sekretion	66
2.5.8.4	Chromfreisetzungs-Assay	67
2.5.9	HLA-Typisierung von eukaryotischen Zellen	68
2.6	<i>in vivo</i> Tierversuche	68

3	Ergebnisse.....	70
3.1	Charakterisierung der verwendeten Zelllinien.....	70
3.1.1	Untersuchung von Oberflächenmarkern	70
3.1.1.1	Tumorzelllinien	70
3.1.1.2	YTS und primäre humane NK-Zellen.....	71
3.1.2	HLA-Typisierung.....	74
3.1.2.1	Tumorzelllinien	74
3.1.2.2	YTS und primäre humane NK-Zellen.....	74
3.2	Klonierungsstrategien und Schemata der eingesetzten Vektoren.....	75
3.2.1	Expressionsplasmide für die Modifizierung von Tumorzelllinien	75
3.2.1.1	Expressionsplasmid für EGFRvIII	75
3.2.1.2	Expressionsplasmid für SDF-1 α	76
3.2.2	Expressionsplasmide für die Modifizierung von Effektorzellen	77
3.2.2.1	Expressionsplasmide für den CXCR4-Chemokinrezeptor.....	77
3.2.2.2	Expressionsplasmide für chimäre Antigenrezeptoren.....	78
3.3	Herstellung und Charakterisierung von SDF-1 α sekretierenden und EGFRvIII-positiven Tumorzellen.....	80
3.3.1	Nachweis der EGFRvIII-Expression	80
3.3.1.1	Nachweis der EGFRvIII-mRNA.....	80
3.3.1.2	Nachweis der EGFRvIII-Oberflächenexpression.....	82
3.3.2	Nachweis der Sekretion von SDF-1 α	83
3.3.3	Klonales Überleben <i>in vitro</i>	84
3.3.4	Tumorzell-Passagierung <i>in vivo</i> und Persistenz der EGFRvIII-Expression sowie SDF-1 α -Sekretion.....	85
3.4	Herstellung und Charakterisierung der YTS- und NK-Effektorzellen mit chimären Antigenrezeptoren und Expression des CXCR4-Chemokinrezeptors.....	86
3.4.1	YTS-Zellen.....	86
3.4.1.1	Nachweis der korrekten Proteinexpression der eingebrachten Rezeptoren in Zelllysaten	86
3.4.1.2	Nachweis der Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und des Chemokinrezeptors.....	88
3.4.2	Primäre humane NK-Zellen.....	89
3.4.2.1	Isolation von primären humanen NK-Zellen aus peripherem Blut.....	89

3.4.2.2	Nachweis der Proteinexpression der eingebrachten Rezeptoren in Zelllysaten	90
3.4.2.3	Nachweis der Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und Chemokinrezeptoren	92
3.5	Funktionalität der Effektorzellen <i>in vitro</i>	93
3.5.1	Migratorisches Potential	94
3.5.1.1	YTS-Zellen	94
3.5.1.2	Primäre humane NK-Zellen	95
3.5.2	Zytotoxisches Potential	96
3.5.2.1	Aktivierung der zytotoxischen Signalkaskade in CAR-modifizierten YTS-Zellen durch Phosphorylierung von ZAP70	96
3.5.2.2	Chromfreisetzung-Assay mit CAR-modifizierten YTS-Zellen	97
3.5.2.3	Chromfreisetzung-Assay mit CAR- und Chemokinrezeptor-tragenden YTS-Zellen	100
3.5.2.4	Nachweis der Degranulation in NK-Zellen – CD107a-Freisetzung	101
3.5.2.5	Überprüfung der INF γ -Sekretion durch NK-Zellen	102
3.5.2.6	Chromfreisetzung-Assay mit NK-Zellen	103
3.6	<i>In vivo</i> Migration systemisch applizierter YTS-Effektorzellen zu etablierten subkutanen Tumoren	106
3.7	<i>In vivo</i> Zytotoxizität	108
3.7.1	Subkutane Koinjektion von Zielzellen und YTS-Effektorzellen	108
3.7.2	Systemische Therapie von etablierten subkutanen Tumoren mit YTS-Effektorzellen	110
3.7.3	Kombination von Migration und Zytotoxizität modifizierter YTS-Effektorzellen zur systemischen Therapie von etablierten subkutanen Tumoren	111
4	Diskussion	114
4.1	Die eingesetzten Zellen werden durch unterschiedliche Oberflächenmarker charakterisiert	115
4.2	Nach gentechnischer Veränderung exprimieren die eingesetzten Tumorzelllinien EGFRvIII und SDF-1alpha	117
4.3	NK-Zellen exprimieren nach gentechnischer Veränderung stabil den CXCR4-Chemokinrezeptor und einen EGFRvIII-spezifischen chimären Antigenrezeptor	118
4.4	Der CXCR4-Chemokinrezeptor und der EGFRvIII-spezifische Antigenrezeptor sind <i>in vitro</i> funktionell	121
4.5	Mit dem chimären Antigenrezeptor armierte NK-Zellen verringern das Wachstum EGFRvIII-positiver Gliomzellen <i>in vivo</i>	125

4.6	Möglichkeiten zur Optimierung der EGFRvIII-spezifischen Immuntherapie und weiterführende Arbeiten.....	126
4.7	NK-Zellen mit kombinierter SDF-1alpha-Chemotaxis und Reaktivität gegen EGFRvIII-positive Gliomzellen führen zur verbesserten Tumoreliminierung <i>in vivo</i>	127
5	Literaturverzeichnis	129
6	Anhang.....	148
6.1	Vektorkarten	148
6.1.1	pHATtrick-EGFP	148
6.1.2	pHATtrick-puroR	149
6.1.3	p6NST50-SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR.....	150
6.2	DNA-Sequenzen	151
6.2.1	CXCR4_hygroR.....	151
6.2.2	CXCR4_puroR.....	152
6.2.3	Ig κ _DAP12_puroR.....	152
6.2.4	Ig κ _MR1.1_DAP12 ^{mut}	153
6.2.5	Ig κ _MR1.1_DAP12.....	154
6.2.6	SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR	155
6.2.7	EGFRvIII_puroR.....	156
6.3	Abbildungsverzeichnis.....	157
6.4	Tabellenverzeichnis	158
6.5	Formelverzeichnis.....	159
6.6	Abkürzungsverzeichnis	160
6.7	Eidesstattliche Erklärung.....	163
6.8	Lebenslauf	164
6.9	Liste der Publikationen und Konferenzbeiträge	165

1 EINLEITUNG

1.1 GLIOME

In Deutschland sind, laut Zahlen der Weltgesundheitsorganisation WHO, Krebserkrankungen die zweithäufigste Todesursache nach kardiovaskulären Erkrankungen. Sie entstehen aus einer einzelnen transformierten Zelle, die mehrere genetische Veränderungen vor allem in zellulären Signalwegen angesammelt hat. Diese Veränderungen sind meist sehr komplex und variieren zwischen den verschiedenen Tumorarten. Überall jedoch ist die Balance zwischen tumorsuppressiven und onkogenen Genen gestört. Damit gewinnen Tumorzellen Eigenschaften, über die normale somatische Zellen nicht verfügen, u. a. ein unbegrenztes Wachstumspotential und eine Resistenz gegen inhibitorische und apoptotische Signale. Zudem können Tumore das Wachstum von Blutgefäßen und damit ihre Eigenversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen induzieren sowie in angrenzende und entfernte Gewebe auswandern und Metastasen bilden (*Hanahan2000*). Eine sehr aggressive Krebserkrankung ist das Glioblastoma multiforme (GBM).

1.1.1 Charakteristik

Das GBM wurde von der WHO als Grad IV klassifiziert und bildet etwa 70 % aller astrozytären oder oligodendroglialen Hirntumore (*Louis2007*). Es werden das primäre GBM und das sekundäre GBM unterschieden. Beide sind zwar histologisch sehr ähnlich, aber verschiedene Tumorentitäten (*Peiffer1999*), die sich auf getrennten genetischen Wegen entwickeln. Eine ausführliche Charakterisierung und ein Vorschlag, wie diese Wege aussehen könnten, finden sich in einem Review von Ohgaki und Kleihues (*Ohgaki2012*). Die Autoren fassen zusammen, dass sich das primäre GBM *de novo* entwickelt, ohne dass ein weniger maligner Vorläufertumor vorgelegen haben muss. Patienten sind bei Diagnosestellung durchschnittlich zwischen 45 und 70 Jahre alt. Die Tumorzellen zeigen neben EGFR-Überexpression und EGFR-Mutationen häufig PTEN-Mutationen, p16-Amplifikationen und chromosomale Veränderungen. Der Verlust des Chromosoms 10 geht mit der Deletion des Tumorsuppressorgens PTEN einher (*Tohma1998*), und beeinflusst so den EGFR/PTEN/Akt/mTOR-Signalweg. Dieser ist ausschlaggebend für die Entwicklung eines primären Glioblastoms (*Kita2007*). Das sekundäre GBM tritt häufiger bei jüngeren Patienten auf und stammt aus der malignen Progression eines weniger aggressiven Astrozytoms (WHO-Grad II und III) (*Ohgaki2012*). Hier gelten vor allem IDH1-Mutationen (*Watanabe2009*) und TP53-Mutationen (*Ohgaki2004*) als frühe diagnostische Marker. P53 ist ein Tumorsuppressor, der wichtige Aufgaben während des Zellzyklus, der Reparatur von DNA-Schäden, der Zelldifferenzierung und des Zelltods übernimmt (*Bögler1995*), weshalb Mutationen an dieser Stelle zu unkontrolliertem Wachstum von Tumorzellen führen können. Das IDH1-Gen kodiert für die Isocitratdehydrogenase-1, die ein Teil des energieerzeugenden Krebszyklus ist. IDH1-Mutationen oder Hypermethylierungen führen u. a. zur verstärkten Expression von HIF-1 α („hypoxia-inducible factor-1 α) und VEGF

(„vascular endothelial growth factor“) (*Zhao2009*) sowie zu Veränderungen der Basalmembran (*Sasaki2012*). Die dadurch erleichterte Neoangiogenese und Invasion dürften wesentliche Ursachen für eine Tumorprogression sein.

1.1.2 Evasionsstrategien

Glioblastome haben verschiedene Evasionsstrategien entwickelt, um die Immunüberwachung („immune surveillance“) zu unterwandern. Unter anderem sekretieren sie immunsuppressive Zytokine wie TGF β (*Schneider2006*), programmieren Monozyten zu einem immunsuppressiven, die Invasion und Neoangiogenese fördernden Phänotyp um (*Wu2010*) oder modulieren die T-Zell-Aktivität (*Wei2010*). Außerdem erschwert eine ineffiziente Antigenprozessierung in Gliomzellen die T-Zell-Erkennung (*DiTomaso2010*). Die genetischen Veränderungen und Evasionsstrategien von Glioblastomen sind ursächlich für ihren sehr malignen Phänotyp und ihre Resistenz gegenüber den üblichen Behandlungsstrategien. Die mittlere Überlebenszeit ohne Therapie beträgt für Patienten mit sekundärem GBM 7,8 Monate, wohingegen Patienten mit primärem GBM im Durchschnitt nur 4,7 Monate überleben (*Ohgaki2004*). Werden alle derzeit durchführbaren Therapieformen ausgeschöpft, kann sich das mittlere Überleben zwar auf durchschnittlich 14,6 Monate verlängern (*Stupp2009*), dennoch ist dies lediglich palliativ und lebensverlängernd. Das GBM ist bis heute nicht heilbar.

1.2 ADJUVANTE IMMUNTHERAPIE VON TUMORERKRANKUNGEN

Üblicherweise werden Tumorerkrankungen behandelt, indem solide Tumore reseziert werden, gefolgt von einer Strahlen- und / oder Chemotherapie. Dies ist für die Patienten oft belastend und aufgrund der fehlenden Selektivität dieser Behandlungsmethoden mit Nebenwirkungen verbunden (*Carlotto2013*). Zudem treten, trotz großer Fortschritte der konventionellen Behandlungsmethoden, über kurz oder lang bei vielen Patienten Rezidive auf. Die angewandten Maßnahmen erfassen abgesiedelte Metastasen, tumorinitierende Krebsstammzellen („cancer stem cells“, CSC) oder minimale Resterkrankungen („minimal residual disease“) häufig nur unzureichend. Für deren Bekämpfung wird daher große Hoffnung in verschiedene immuntherapeutische Verfahren gesetzt (*Restifo2012*). Die gegen Tumore gerichtete Aktivierung des körpereigenen Immunsystems könnte die Überlebens- und Heilungschancen von Patienten erhöhen. Denn dass das Immunsystem prinzipiell fähig ist, maligne Zellen zu erkennen und dagegen vorzugehen, wurde schon im vorigen Jahrhundert erkannt (*Ehrlich1906, Burnet1970, vanPel1982*). In Krebspatienten wurden sowohl Antikörper gegen tumorassoziierte Antigene („tumor-associated antigens“, TAA) als auch spezifische Effektor-T-Lymphozyten gegen Tumorzellepitope gefunden (*Shankaran2001*). Obwohl das Immunsystem offensichtlich eine antitumorale Antwort generieren kann, ist es dennoch oft unfähig, maligne Zellen effektiv zu bekämpfen. Eine zusätzlich zu konventionellen Behandlungsmethoden durchgeführte (adjuvante) Immuntherapie soll daher die natürlichen Eigenschaften des Immunsystems verstärken und

nachhaltig unterstützen sowie immuninhibitorische Faktoren eliminieren. Dies kann zum einen durch die Stimulation des Immunsystems z. B. über die systemische Gabe von Zytokinen (Vacchelli2013a) oder über eine Tumorstimmung (Aranda2013) geschehen. Weiterhin ist die Applikation von monoklonalen Antikörpern oder Einzelkettenfragmenten möglich, die gegen TAA gerichtet sind (Vacchelli2013b). Dabei ist jedoch problematisch, dass Gewebe und besonders solide Tumore aufgrund ihres hohen Turgors nur sehr schwer für Antikörper zugänglich sind (Keizer2010). Rekombinante Antikörper verfügen *in vivo* zwar über längere Halbwertszeiten als Einzelkettenfragmente, doch sie treten aufgrund ihrer Größe nur sehr langsam über Endo- und Pinozytose aus den Blutgefäßen aus. Im Falle von Hirntumoren oder Metastasen im Gehirn ist zudem die Blut-Hirn-Schranke für diese hydrophilen Moleküle undurchlässig (Abbott2005, Dunn2007). Häufig ist das Immunsystem der Patienten durch Bestrahlung und Chemotherapie schon so geschwächt, dass es durch die eingebrachten Antikörper nicht mehr ausreichend aktiviert werden kann. Eine dritte Möglichkeit zur Behandlung von Tumorerkrankungen ist die Rekrutierung der zellulären Immunabwehr. In Tumorgeweben lassen sich tumorinfiltrierende Lymphozyten („tumor infiltrating lymphocytes“, TIL) nachweisen, die durch Peptide tumorspezifischer Antigene aktiviert werden können (Rosenberg1986). Diese tumorspezifischen Effektorzellen können aus Patienten isoliert, *ex vivo* aktiviert und anschließend über einen sogenannten adoptiven Transfer („adoptive cell transfer“, ACT) rückinjiziert werden (Rosenberg2004, Gattinoni2006). Diese Methode wird im Allgemeinen gut toleriert und zeigt nur geringe Nebenwirkungen (Burns2003). Zusätzlich wird ein ACT in neuerer Zeit mit einer Lymphodepletion kombiniert, um negative Nebeneffekte z. B. durch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) zu minimieren (Wrzesinski2010, Sampson2014). Behindert wird ein erfolgreicher ACT oft durch „tumor escape“-Mechanismen wie z. B. die Herunterregulation von MHC Klasse I-Molekülen (Haupthistokompatibilitätsfaktoren, „major histocompatibility“) auf der Oberfläche der Tumorzellen, die Sekretion immuninhibitorischer Zytokine oder die Rekrutierung von regulatorischen T-Zellen (Review in Töpfer2011).

Dennoch ist der Einsatz von zytotoxischen Immunzellen, gerade gegen Hirntumore, immer noch vielversprechend. Es gibt überzeugende Hinweise darauf, dass die Blut-Hirn-Schranke bei inflammatorischen Prozessen umgangen werden kann. So nehmen Hirntumore Kontrastmittel auf und TIL wurden in ihrem entzündlichen Infiltrat nachgewiesen (Dunn2007). Schon seit mehreren Jahren sprechen klinische Studien für den Einsatz von Immunzellen im Kampf gegen Glioblastome (Plautz2000, Tsuboi2003, Johnson2010). Nötig sind dabei vor allem schnell wirksame Strategien und kurze Behandlungszeiträume, denn je länger die Therapie dauert, desto mehr Zeit hat der Tumor, sich anzupassen und die Immunabwehr zu umgehen (Ames2014). Die Suche nach weiteren und die Optimierung vorhandener immuntherapeutischer Strategien gehen daher weiter. Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und deren gentechnische Modifizierung könnten ein weiterer möglicher Ansatz für eine Immuntherapie von Tumorerkrankungen sein.

1.3 NATÜRLICHE KILLERZELLEN

1.3.1 Phänotyp

Etwa 5 – 15 % der Zellen im peripheren Blut sind Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Sie sind große, granuläre Zellen, die 1975 erstmals beschrieben wurden (*Herberman1975, Kiessling1975*). Sie werden charakterisiert durch die Expression von CD56 und durch fehlende T-Zell-Marker wie CD3 oder TCR („T cell receptor“). Man unterscheidet zwei Subtypen, CD56^{bright} und CD56^{dim} (*Cooper2001*). CD56^{dim} bilden die Mehrzahl der im Blut zirkulierenden NK-Zellen, sie exprimieren CD16 und Killerzell-Immunrezeptoren („killer cell immunoglobulin-like receptors“, KIR) und sind sehr zytotoxisch. CD56^{bright} sammeln sich vor allem in den Lymphknoten. Sie exprimieren wenig KIR oder CD16, sekretieren nach Stimulation aber große Mengen an Zytokinen und übernehmen eher immunregulatorische Aufgaben.

1.3.2 Wirkungsweise

NK-Zellen sind die wichtigsten Akteure des angeborenen Immunsystems in der Abwehr von viralen Infektionen und der malignen Transformation von Zellen (*Yokoyama2004, Ferlazzo2004*). Sie exprimieren eine Vielzahl an invarianten, keimbahnkodierten Rezeptoren (*Moretta2004, Lanier2008*), die veränderte Strukturen auf Zelloberflächen erkennen. Anders als T- oder B-Zellen benötigen sie für ihre Aktivität keine vorangegangene Sensitivierung. Stattdessen werden NK-Zellen durch ein System von aktivierenden und inhibierenden Signalen reguliert (*Cerwenka2001, Hallett2006, Sutlu2009*). Die Integration der verschiedenen Signale erfolgt über eine dynamische Bindung zwischen NK-Zelle und Zielzelle, die „immunologische Synapse“ (*Davis1999*). Im Normalfall induzieren Interaktionen von inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren mit MHC Klasse I-Molekülen auf autologen Zellen dominant negative Signale, die stärker als aktivierende Signale sind und so eine zytotoxische Aktivität verhindern (*Moretta2004*). Fehlen diese negativen Signale oder werden sie durch aktivierende Signale übertroffen, werden NK-Zellen aktiviert und töten ihre Zielzellen – ähnlich wie CD8⁺ T-Zellen – durch Sekretion von Perforin und Granzymen (*Smyth2005*). Außerdem sekretieren sie inflammatorische Zytokine wie Tumornekrosefaktor(TNF) α und Interferon(INF) γ (*Smyth1998, Smyth2001*) und besitzen Todesrezeptoren-Liganden wie TRAIL oder FasL (*Oshimi1996*).

Die Regulation der NK-Zell-Aktivität beruht auf verschiedenen Mechanismen (*Lanier2008, Bryceson2011*). Ein Erkennungsmechanismus wurde erstmals 1986 als sogenannte „missing self“-Hypothese formuliert (*Kärre1986*). Hier reagieren NK-Zellen auf eine fehlende oder niedrige Oberflächenexpression von klassischen MHC Klasse I-Molekülen auf anderen Zellen. Normalerweise binden NK-Zellen mit ihren KIR an ein monomeres Peptid, das sich aus der Leadersequenz der MHC Klasse I-Moleküle ableitet und werden dadurch von ihrer zytotoxischen Aktivität abgehalten. Tumore und virusinfizierte Zellen regulieren häufig

MHC Klasse I herunter, um einer T-Zell-Überwachung zu entgehen. Fehlen jedoch autologe MHC Klasse I-Moleküle, können sie somit immer noch von NK-Zellen erkannt und eliminiert werden. Ein weiterer Mechanismus ist das sogenannte „induced self“. Hier wird durch NK-Zellen die durch Zellstress induzierte Ligandenexpression z. B. von MIC-Molekülen („MHC class I chain related antigens“), auf der Oberfläche von Tumorzellen erkannt. Drittens werden NK-Zellen durch „altered self“ aktiviert, erkennen also die Expression von „fremden“ Molekülen. Diese werden von intrazellulären Pathogenen oder intratumoralen Stoffwechselprozessen gebildet und dann auf der Oberfläche der modifizierten Zellen u. a. von HLA-E als modifizierte Peptide präsentiert. Auch Änderungen in der Glykosylierung von Oberflächenstrukturen werden von NK-Zellen bemerkt. Einen in Tabelle 1 zusammengefassten Überblick über die verschiedenen Rezeptortypen auf NK-Zellen sowie deren korrespondierende Liganden gibt ein Review von Lanier et al. (*Lanier2008*).

Tabelle 1 NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden

Name	CD-Nummer	Ligand	Funktion
KIR	CD158	HLA-ABC	DL: inhibierend DS: aktivierend
NKG2A	CD159a	HLA-E	inhibierend
NKG2C	CD159c	HLA-E	aktivierend
NKG2D	CD314	MIC A/B, ULBP	aktivierend
NKp30	CD337	u. a. BAT-3, B7-H6, CMV pp65	aktivierend
NKp44	CD336	u. a. virale Glykoproteine, Heparin, Influenza-Hemagglutinin	aktivierend
NKp46	CD335	u. a. Vimentin, Heparin, Influenza-Hemagglutinin	aktivierend
ILT2	CD85j	HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-G, HLA-F, CMV UL18	aktivierend
FcγRIIIA	CD16	Fc von IgG-Immunkomplexen	aktivierend
DNAM-1	CD226	Nektin, PVR	aktivierend
2B4	CD244	CD48	aktivierend

Die wichtigsten NK-Zell-Rezeptoren sind KIR, Typ-I-Proteine mit Immunoglobulin-ähnlichen Domänen. Jeder KIR erkennt einen bestimmten Untertyp von MHC Klasse I-Molekülen (HLA-ABC). Binden die KIR mit langer intrazytoplasmatischer Domäne (DL) an ihren Liganden, wird über ihr ITIM („immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif“) ein inhibitorisches Signal vermittelt, d. h. je weniger MHC Klasse I auf der Oberfläche einer potentiellen Zielzelle exprimiert wird, desto weniger inhibitorische Signale erhält die NK-Zelle. HLA-E wird über NKG2A / CD94 erkannt, dieser Rezeptor wirkt ebenso inhibitorisch. Einige KIR verfügen jedoch über eine kurze intrazytoplasmatische Domäne (DS) und vermitteln nach Rekrutierung eines Signaltransduktionsmoleküls (z. B. CD3ζ, DAP10 oder DAP12) über dessen ITAM („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“) ein aktivierendes Signal. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die verschiedenen KIR-Subtypen und deren Liganden. Weitere wichtige aktivierende NK-Zell-Rezeptoren sind NKG2D und die Natürlichen Killer-Zell-Rezeptoren (NCR) NKp30, NKp44 und NKp46. Die

Liganden der NCR werden auf gestressten, virusinfizierten oder transformierten Zellen exprimiert. NKp30 bindet unter anderem an BAT-3, B7-H6 und das CMV pp65-Protein, NKp44 erkennt virale Glykoproteine z. B. in der West Nile und Dengue-Virus Hülle (Hershkovitz2009). Ein Ligand von NKp46 ist Vimentin auf der Oberfläche von Tbc-infizierten Zellen (Garg2006). NKp44 und NKp46 binden auch das Influenza-Hemagglutinin. Welche Liganden Tumore exprimieren, ist noch weitgehend unbekannt, dennoch erfolgt deren Erkennung häufig über diese NCR-Rezeptoren (Lakshmikanth2009). Eine dritte Familie von aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren sind die C-Typ-Lektinähnlichen Rezeptoren NKG2D und NKG2C / CD94. NKG2C / CD94 bindet an HLA-E, das z. B. nach Infektionen mit dem Zytomegalie-Virus (CMV) auf der Oberfläche von Zellen stabilisiert wird (Malmberg2012). NKG2D erkennt vor allem Stressproteine wie MIC A/B und ULBP (Bauer1999), die während sehr schneller Proliferation auf der Oberfläche von Zellen exprimiert werden (Jung2012).

Weitere aktivierende Rezeptoren sind CD16, DNAM-1 und 2B4. Über CD16, den FcγRIII, wird die antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität von NK-Zellen („antibody dependent cell mediated cytotoxicity“, ADCC) reguliert. Zudem exprimieren NK-Zellen TRAIL und FasL (Oshimi1999) und induzieren damit Apoptose in ihren Zielzellen. Über die verschiedenen Möglichkeiten von NK-Zellen, nach Induktion eines aktivierenden Signals ihre Zielzellen zu eliminieren, informiert Abbildung 1.

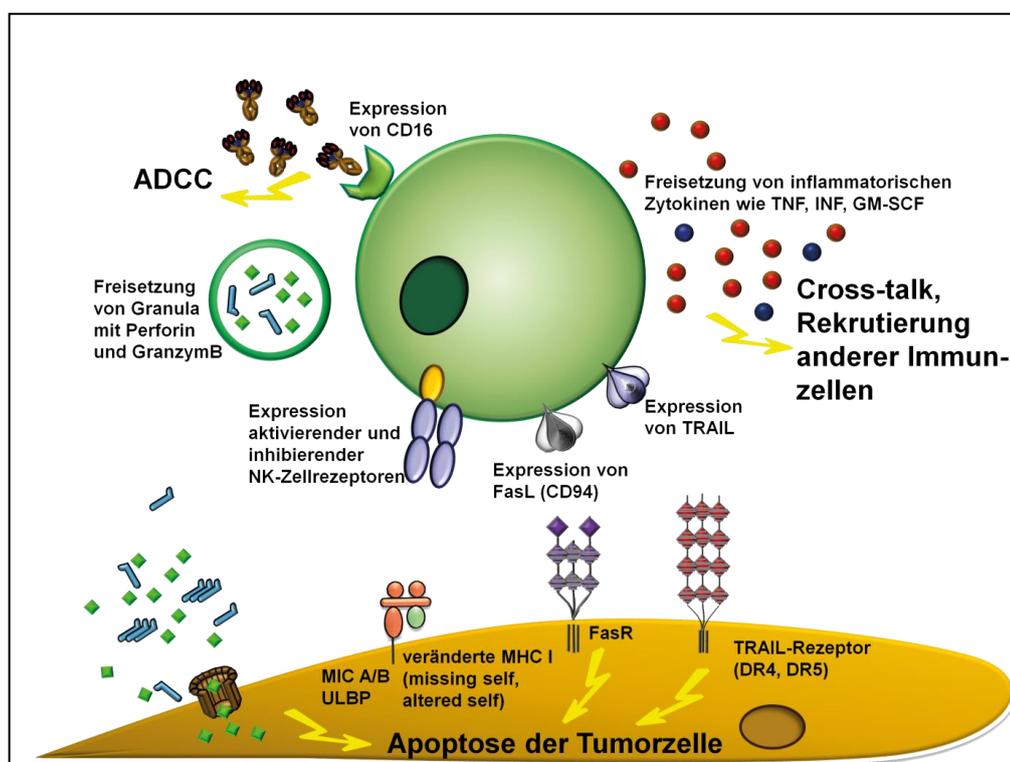


Abbildung 1 Überblick Tötungsmechanismen von NK-Zellen. NK-Zellen verfügen über ein breites Repertoire von Erkennungs- und Effektormechanismen, mit dem sie virusinfizierte oder maligne Zellen erkennen und abtöten können. Dazu gehören die Freisetzung von zytolytischen Molekülen wie Perforin und Granzymen oder inflammatorischen und immunmodulierenden Zytokinen, die über CD16 vermittelte

antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC), die Vermittlung von apoptotischen Signalen über TRAIL und FasL sowie die Erkennung von veränderten Oberflächenstrukturen durch verschiedene NK-Zell-Rezeptoren.

Obwohl NK-Zellen die wichtigsten Vertreter der frühen, angeborenen Immunantwort sind, übernehmen sie auch weitere Aufgaben und vernetzen so das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem. Sie unterstützen durch die Sekretion bestimmter Zytokine im sogenannten „cross-talk“ u. a. das Wachstum von myeloiden Zellen und die Reifung dendritischer Zellen („dendritic cells“, DC) (Gerosa2002, Barao2003), stimulieren antigen-präsentierende Zellen (APC), modulieren die T-Zellantwort hin zu T-Helferzellen (Th1) (Morandi2006) und helfen bei der Gewebereparatur. Außerdem gibt es erste Hinweise darauf, dass NK-Zellen mit spezifischer Oberflächenexpression von inhibitorischen und aktivierenden Rezeptoren sogar eine Art Gedächtnis („memory“) ausbilden, eine Eigenschaft, die zuvor nur B- und T-Zellen zugeschrieben wurde. Einige Gruppen (O’Leary2006, Sun2010, Paust2011, Fu2013) erkannten im Mausmodell, dass auch NK-Zellen sich zu langlebigen Zellen entwickeln und ein zweites oder drittes Mal auf ein Pathogen reagieren können. Die selektive Expansion und Erhaltung von NK-Zellen mit hoher Avidität zu bereits bekannten Pathogenen stellt möglicherweise einen Mechanismus dar, die zeitige Immunantwort gegen virale Infektionen zu optimieren.

1.4 VOR- UND NACHTEILE VON AUF NK-ZELLEN BASIERENDEN IMMUNTHERAPEUTISCHEN ANSÄTZEN

Aufgrund ihrer Eigenschaften erscheinen Strategien, die das natürliche antitumorale Potential von NK-Zellen nutzen, als eine vielversprechende Option für die Immuntherapie von Krebserkrankungen. Natürlich hat der Einsatz von NK-Zellen sowohl Vor- als auch Nachteile. Es ist zunächst nicht sehr einfach, NK-Zellen zu isolieren. Aus Patienten gewonnene NK-Zellen zeigen z. T. funktionelle Störungen oder sind nach *ex vivo* Stimulation nicht ausreichend zytotoxisch. Da NK-Zellen nur eine kleine Population innerhalb der mononukleären Zellen des peripheren Bluts („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) bilden, gestaltet sich die Expansion von ausreichenden Mengen an aktivierten NK-Zellen für einen adoptiven Transfer häufig schwierig. Auch das für die Expansion und Aktivierung der NK-Zellen benötigte Zytokin IL-2 ist problematisch. *In vivo* ist es in hohen Dosen toxisch, es greift z. B. Blutgefäße an und führt zum „vascular leak syndrome“. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass durch IL-2 weniger der zytotoxische CD56^{dim} Subtyp sondern eher der CD56^{bright} Subtyp der NK-Zellen stimuliert wird (Meropol1996). Zudem zeigen Studien, dass durch die systemische Gabe von IL-2 auch regulatorische T-Zellen (T_{reg}) stimuliert und so die Effekte einer Immuntherapie negativ beeinflusst werden können (Shevach2000, Ghiringhelli2006).

Vorteilhaft ist jedoch, dass NK-Zellen ihre Ziele unabhängig von einer Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle erkennen und über ein breites Repertoire an Erkennungs- und

Tötungsmechanismen verfügen. Es wurde bereits gezeigt, dass NK-Zellen in der Lage sind, zirkulierende Tumorzellen („circulating tumor cells“, CTC) (Tallerico2013) und Krebsstammzellen („cancer stem cells“, CSC) anzugreifen (Jewett2012). Zudem gibt es einige Studien darüber, dass der Einsatz von Medikamenten wie Bortezomib Krebszellen *in vitro* für eine NK-Zell-vermittelte Lyse sensitivieren kann (Ames2009, Berg2009). Auch die systemische Gabe von IL-2 allein (Sutlu2009) kann die NK-Zell-Aktivität steigern und zu einer Verbesserung der Überlebensraten führen. Außerdem neigen NK-Zellen bei einer allogenen Stammzelltransplantation weniger als T-Zellen zu einer Graft-versus-Host-Reaktion (GVHD), bei der das Gewebe des Empfängers durch die Immunzellen des Donors als „fremd“ erkannt und angegriffen wird. Stattdessen reagieren sie in einer Graft-versus-Tumor-Reaktion (GVT) verstärkt gegen Tumorzellen (Barao2003). Ruggeri et al. erkannten zudem die Korrelation zwischen der KIR-Ausstattung des Donors und dem HLA-Typ des Empfängers (Ruggeri1999, Ruggeri2002). Wenn die NK-Zellen des Donors KIR exprimierten, für die der Empfänger keine passenden Liganden hatte („mismatch“), kam es zu verbesserten GVT-Effekten in AML-Patienten. So wurden tumorfreie Überlebenszeiten von über fünf Jahren erreicht. Solide Tumore wie Melanome und Nierenkrebs zeigten *in vitro* eine erhöhte Suszeptibilität gegen NK-Zell-Lyse, wenn diese KIR-mismatched waren (Igarashi2004). Der GVT-Effekt tritt auch bei autologen Transplantationen auf, wenn den Patienten wenigstens ein Ligand für ihre eigenen inhibitorischen KIR fehlt (Venstrom2009). Welche HLA-Liganden die jeweiligen KIR-Subtypen binden, zeigt Tabelle 2 (adaptiert aus Lanier2009).

Tabelle 2 Überblick KIR-HLA-Interaktionen

Name	CD-Nr.	Ligand	Funktion
KIR2DL1	CD158a	HLA-C2	inhibierend
KIR2DL2 / KIR2DL3	CD158b1/2	HLA-C1, schwach: HLA-C2 und HLA-B	inhibierend
KIR2DL5	CD158f	Unbekannt	inhibierend
KIR3DL1	CD158e1	HLA-B ^{Bw4} , HLA-A ^{Bw4}	inhibierend
KIR3DL2	CD158k	HLA-A3, HLA-A11	inhibierend
KIR3DL3	CD158z	Unbekannt	inhibierend
KIR2DL4	CD158d	HLA-G	aktivierend
KIR2DS1	CD158h	HLA-C2	aktivierend
KIR2DS2	CD158j	möglicherweise HLA-C1	aktivierend
KIR2DS3	CD158b2	möglicherweise HLA-C1	aktivierend
KIR2DS4	CD158i	HLA-C1, HLA-C2 und HLA-A11	aktivierend
KIR2DS5	CD158g	Unbekannt	aktivierend
KIR3DS1	CD158e2	HLA-C2, möglicherweise HLA-B ^{Bw4}	aktivierend

1.5 KLINISCHE STUDIEN MIT NK-ZELLEN

Da NK-Zellen zumeist im Blut und weniger in soliden Tumoren vorhanden sind, wurden klinische Erfolge bis jetzt hauptsächlich bei hämatologischen Tumoren erreicht (*Rizzieri2010, Curti2011, Shimasaki2012*). Der Einsatz von NK-Zellen gegen solide Tumore war bis jetzt weniger erfolgreich (*Terme2008, Parkhurst2011*). Ein aktueller Review von Cheng et al. gibt einen umfassenden Überblick über alle bisherigen Studien mit NK-Zellen (*Cheng2013*). Der Einsatz von primären humanen NK-Zellen ist selten, denn die Expansion ausreichender Zahlen von NK-Zellen aus PBMC ist, wie bereits beschrieben, nicht ganz einfach. Es existieren verschiedene Protokolle, u. a. mit K562 als „feeder“-Zellen (*z. B. bei Imai205, Li2010, Shimasaki2012*) und ein klinisch anwendbares Protokoll, welches auf MACS-Basis beruht. In einer Phase I Untersuchung zeigte es keine Nebenwirkungen in Patienten mit Metastasen und hämatologischen Tumoren (*Berg2009*). Die Aktivierung von NK-Zellen, ihre Expansion und Verbesserung der antitumoralen Aktivität gelingt über die Gabe von Zytokinen. Aktivierte NK-Zellen sind im Vergleich zu frisch isolierten ruhenden NK-Zellen wesentlich zytotoxischer gegenüber Tumorzellen (*Berg2009*). Vor allem IL-2 aber auch IL-12, IL-15, IL-18 und IL-21 werden hierfür genutzt.

Der Einsatz von NK-Zellen für die Immuntherapie begann mit dem adoptiven Transfer von *ex vivo* mit IL-2 voraktivierten Lymphokin-aktivierten Killerzellen (LAK-Zellen), was jedoch keine Verbesserungen bei der Behandlung von Melanomen, Lymphomen oder Brustkrebs mit sich brachte (*Rosenberg1985, Burns2003*). Der adoptive Transfer von autologen, voraktivierten NK-Zellen hatte in klinischen Phase I Studien keine Nebenwirkungen für Patienten mit kolorektalem Krebs, Lungenkrebs, Melanomen oder Nierenkrebs. Aber auch hier wurden kaum signifikante Verbesserungen erzielt (*Krause2004, Parkhurst2011*), weswegen weitere klinische Studien mit diesen Zellen zunächst abgebrochen wurden. Vielversprechend scheint inzwischen der Einsatz von allogenen NK-Zellen haploidentischer Spender mit einem KIR-mismatch (*Igarashi2004*). Bei AML und anderen Krebsarten wie Lymphomen, Leukämie und soliden Tumoren wurde deren Sicherheit und klinische Effektivität gezeigt (*Iliopoulou2010, Rizzieri2010, Curti2011*). Inzwischen sind einige Studien für diese Zellen in Phase II und auch der Einsatz von NK-Zellen für die Therapie von Gliomen erscheint praktikabel.

1.6 NK-ZELLEN UND HIRNTUMORE

Die bei allen Organismen mit höher entwickeltem zentralen Nervensystem vorhandene Blut-Hirn-Schranke („blood-brain-barrier“, BBB) (*Abott2005*) und deren strikte Regulation führten zu dem Postulat, das Gehirn sei „immunprivilegiert“ (*Barker1997*). Die BBB kombiniert „tight junctions“ zwischen den Endothelien der Blutgefäße mit einer strengen Transportregulation für Ionen, Neurotransmitter und Makromoleküle (*Dunn2007*). Nur kleine, lösliche Moleküle gelangen unter normalen Bedingungen durch die BBB hindurch. Der Eintritt von Immunzellen ins Gehirn erfolgt zumeist nur nach Schlaganfällen oder

anderen Traumata oder wenn aktivierte Neutrophile die BBB angreifen (Scholz2007). Dennoch können mononukleäre Leukozyten, Monozyten und Makrophagen zu Entzündungsherden im Gehirn rekrutiert werden (Davoust2008), wenn die „tight junctions“ zwischen den endothelialen Zellen z. B. durch bestimmte Zytokine durchlässiger werden (Konsman2007). Es wurde gezeigt, dass Hirntumore zum einen generell die Struktur der Vaskularisierung im Hirn verändern und so die BBB durchlässiger machen (Dunn2007). Zum anderen schütten sie eine Vielzahl von Chemokinen aus, die chemotaktisch auf Lymphozyten wirken (Bajetto2006).

Im Jahr 2004 gelang die Isolation von NK-Zellen aus Patienten mit hochgradigem GBM, die nach *ex vivo* Aktivierung in einem autologen adoptiven Transfer zurück in die Resektionshöhle appliziert zu einer statistisch signifikanten Verbesserung des Überlebens der Patienten führten (Ishikawa2004). Das heißt, sie müssen die Tumorzellen erkannt haben und effektiv gegen sie vorgegangen sein. Laut einem aktuellen Review von Kmiecik et al. gelangen auch NK-Zellen unter inflammatorischen Bedingungen durch die Blut-Hirn-Schranke. Doch sind es im Vergleich zu T-Zellen geringere Zahlen von Zellen, die vor allem perivaskulär im Stroma und Tumorparenchym gefunden werden (Kmiecik2014). Studien beweisen dennoch, dass NK-Zellen prinzipiell in der Lage sind, gegen Hirntumore vorzugehen, sowohl *in vitro* (Castriconi2009, Avril2012) als auch im Tierversuch (Friese2004, Prins2006, Alizadeh2010, Poli2013).

1.7 IMMUNTHERAPIE VON GLIOBLASTOMA MULTIFORME MIT GENETISCH MODIFIZIERTEN ZYTOTOXISCHEN ZELLEN

In vitro Versuche haben bereits gezeigt, dass Tumorgewebe NK-sensitiv sind. *In vivo* dringen aber im Vergleich zu anderen zytotoxischen Zelltypen nur wenige NK-Zellen in solide Tumore ein (Kmiecik2014). Eine verbesserte Migration und eine Optimierung der zytotoxischen Effektormechanismen könnten daher vielversprechende Ziele für eine Immuntherapie von Glioblastomen darstellen. Genetische Modifizierungen von NK-Zellen, die deren Zytotoxizität modulieren und weiter verbessern, beinhalten u. a. eine Überexpression von aktivierenden und eine Inhibierung von inhibierenden Rezeptoren oder – wie im Falle der vorliegenden Arbeit – das Umlenken der NK-Zellen auf bestimmte tumorassoziierte Antigene über einen chimären Antigenrezeptor. Mögliche Ziele einer Immuntherapie von Gliomen werden bei Dunn et al. diskutiert (Dunn2007). Im Rahmen dieser Arbeit wird sich auf den EGFRvIII und SDF-1 α konzentriert.

1.7.1 Der EGFRvIII als Ziel einer gelenkten Zytotoxizität

1.7.1.1 Der EGFRvIII als Oberflächenmarker für Glioblastoma multiforme

Der Wildtyp-Rezeptor EGFR („epidermal growth factor receptor“) ist Mitglied der ErbB-Familie, die aus vier nah miteinander verwandten Rezeptortyrosinkinasen (EGFR, HER2/c-neu, Her3 und Her4) besteht (Gullick1998), und wird auf Chromosom 7p12 kodiert. Er ist einer der am häufigsten überexprimierten Zelloberflächenmarker bei einer Vielzahl humaner Krebserkrankungen (Kuan2001). Als Transmembran-Glykoprotein verfügt er über eine cysteinreiche extrazelluläre Domäne und intrazelluläre Tyrosinkinase- und Autophosphorylierungs-Stellen am C-terminalen Ende. Nach Interaktion mit seinen Liganden EGF und TGF α dimerisiert der Rezeptor und autophosphoryliert seine eigenen Tyrosinreste. Es folgt die Rekrutierung verschiedener downstream-Moleküle über eine Aktivierung des Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt Signalwegs (Narita2002), was die Proliferation von Zellen fördert. Dieser Signalweg wird durch PTEN kontrolliert (Mellinghoff2005), welches in primären Gliomen häufig verloren gegangen ist (Tohma1998).

Die häufigste onkogene Isoform des EGFR ist der EGFRvIII (Wikstrand1998). Er ist ein besonders lohnenswertes Ziel für eine Immuntherapie, da er ausschließlich auf malignen Zellen exprimiert wird. Etwa 30 – 40 % aller primären Gliome tragen diesen Rezeptor (Wong1987), er wurde aber auch bei Lungenkrebs, Brustkrebs, Ovarialkarzinomen und Prostatakrebs nachgewiesen (GarciaDePalazzo1993, Moscatello1995). Der EGFRvIII ist 145 kDa groß und damit wesentlich kleiner als der EGFR-Wildtyp mit 170 kDa. Dies liegt an einer 801 Basenpaar in-frame Deletion der mRNA-Exons 2 - 7. Dadurch entsteht ein Protein, dem die cysteinreiche Domäne II und ein Teil der Domäne I fehlen. In diesem sogenannten PEPvIII-Peptid LEEKKGNYVVDH (Aminosäure 1-5 – G – Aminosäure 274-280) wird ein Glycinrest von Aminosäuren flankiert, die sonst weiter auseinander liegen (Wikstrand1998). Dies führt dazu, dass der Rezeptor kein EGF binden kann. Wird der EGFRvIII in die humane Gliomzelllinie U87-MG oder in murine NR.6-Zellen eingebracht, ist die Tumorigenität dieser Zellen in Nacktmäusen dennoch deutlich erhöht (Nishikawa19940). Die konstitutive und ligandenunabhängige Aktivierung des EGFRvIII stellt die Hauptursache für eine gesteigerte Proliferation und Motilität sowie Resistenz der Zellen und somit für den besonders malignen Phänotyp von EGFRvIII-positiven Tumoren dar (Huang1997, Lal2002, Lammering2004, Sampson2010). Die durch den Rezeptor aktivierten Signalwege sind ähnlich wie beim Wildtyprezeptor noch nicht abschließend erforscht. Es wird nach verschiedenen Untersuchungen davon ausgegangen, dass sie sowohl den Ras-Shc-Grb2-Weg (Prigent1996) als auch die konstitutive Aktivierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK) (Antonyak1998) und des NF κ B-IL-8-Signalwegs (Bonavia2011) involvieren. Ähnlich wie bei Überexpression des EGFR wt wurden auch bei Expression des EGFRvIII hohe Level von Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase nachgewiesen (Moscatello1998). Der Hauptunterschied liegt wohl darin, dass der Wildtyprezeptor nach Ligandenbindung dimerisiert, schnell densensitiviert und internalisiert wird, während der EGFRvIII zumeist monomerisch vorliegt und wesentlich

langsamer abgebaut wird. Zudem vermittelt der EGFRvIII über Bcl_{XL} ein starkes anti-apoptotisches Signal (Kuan2001). Es gibt Hinweise darauf, dass der EGFRvIII zu vermehrter Neoangiogenese in Tumorzellen führen kann (Bonavia2011). Abbildung 2 vergleicht zusammenfassend die Signalwege von EGFR wt und EGFRvIII, erhebt aber keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

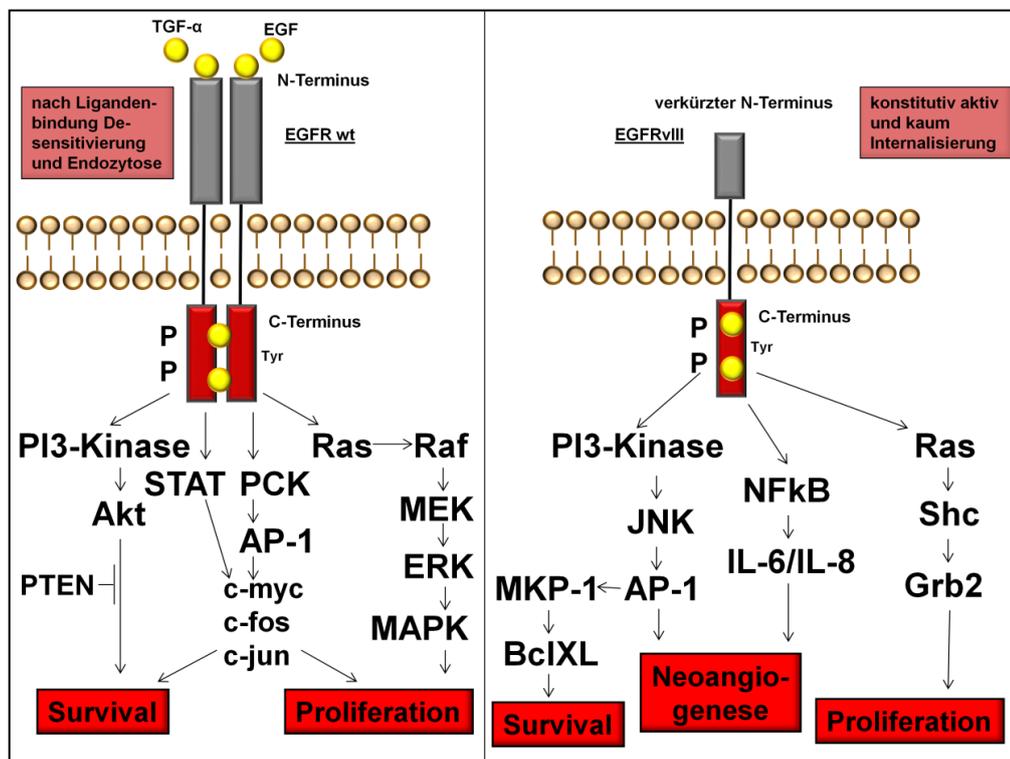


Abbildung 2 Vergleichende Signalwege des EGFR wt und EGFRvIII. Die Aktivierung des Wildtyp-EGFR wird durch Bindung eines Liganden (EGF) an die extrazelluläre Domäne induziert. Eine anschließende Dimerisierung und Auto- oder Trans-Phosphorylierungen an Tyrosinresten des intrazellulären Bereichs rekrutieren Adaptorproteine, welche die Signalweiterleitung über verschiedene Signalwege bis in den Zellkern vermitteln. Die Wirksamkeit des Rezeptors wird durch inhibitorische Moleküle wie PTEN und durch seine rasche Internalisierung nach Ligandenbindung reguliert. Im Gegensatz dazu benötigt der EGFRvIII keine Ligandenbindung oder Dimerisierung für seine konstitutive Aktivierung. Seine intrazellulären Tyrosinreste sind dauerhaft phosphoryliert und befördern dadurch eine stete Signalweiterleitung. Diese vermittelt Zellen, die den EGFRvIII exprimieren, Überlebensvorteile und eine gesteigerte Kapazität zur Neoangiogenese und Proliferation.

Es existieren einige spezifische Einzelkettenantikörper, die an EGFRvIII binden und internalisiert werden (Reviews siehe Wikstrand1998, Kuan2000). Der im Rahmen dieser Arbeit genutzte MR1.1 (Kuan2000) ist ein affinitätsgereifter Nachfolger des Einzelkettenantikörpers MR1, der 1996 aus einer Phage-Display-Bibliothek isoliert wurde (Lorimer1996).

1.7.1.2 Chimäre Antigenrezeptoren als Mediatoren einer gerichteten Immuntherapie

Eine wichtige Voraussetzung für die Ausbildung einer spezifischen Immunreaktion gegen Tumorzellen ist das Vorhandensein antigener Strukturen, durch welche sich die Tumorzellen von normalen Zellen unterscheiden und so vom Immunsystem erkannt werden können. Schon 1991 wurde das erste tumorassoziierte Antigen (TAA) identifiziert (*vanderBruggen1991*). Für eine effektive Immuntherapie müssen TAA an der Oberfläche der Tumorzellen exprimiert werden, die den Tumor möglichst spezifisch auszeichnen. Ist ein gegen dieses TAA gerichteter spezifischer monoklonaler Antikörper verfügbar, können chimäre Antigenrezeptoren konstruiert werden, die dessen Spezifität mit einer zellulären Zytotoxizität verbinden und so eine effektive und tumorspezifische Immunreaktion generieren (*Eshhar2010*). In Abbildung 3 ist der Aufbau eines CAR schematisch dargestellt.

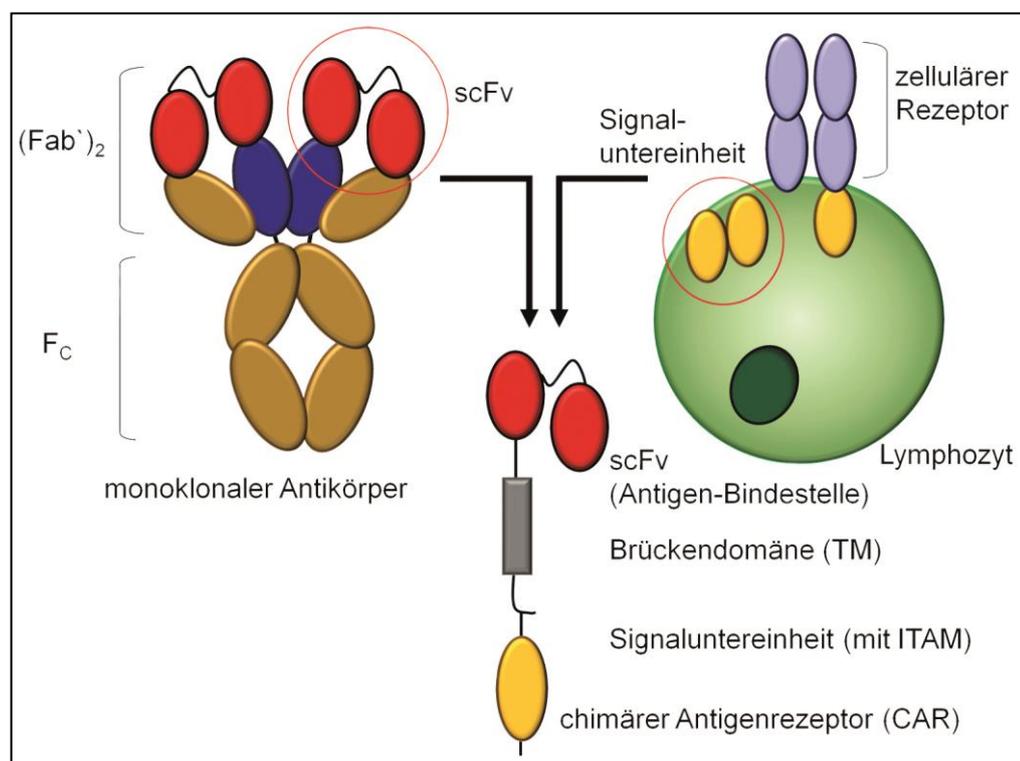


Abbildung 3 Allgemeiner Aufbau eines chimären Antigenrezeptors. Das Einzelkettenfragment eines monoklonalen Antikörpers (scFv) wird über eine Brückendomäne mit Transmembranuntereinheit (TM) mit einem zellulären Signalmolekül zu einem chimären Antigenrezeptor (CAR) fusioniert. Über dessen ITAM („immunoreceptor tyrosine-based activation motifs“) wird nach Antigenbindung ein aktivierendes Signal in die Immunzelle übermittelt. So können Immunzellen spezifisch zu Zielen auf der Oberfläche von Tumorzellen umgeleitet werden, um dort ihre eigenen Effektormechanismen einzusetzen.

Die Antigenbindestelle des chimären Antigenrezeptors besteht aus dem Einzelkettenfragment („single chain fragment variable“, scFv) eines monoklonalen spezifischen Antikörpers. Dessen aus hypervariablen (HR1, HR2, HR3) Regionen gebildeten H- und L-Ketten sind komplementär zu einem bestimmten Antigen und damit für eine spezifische Bindung verantwortlich. Über eine Brückendomäne wird der Einzelkettenantikörper mit einem aktivierenden zellulären Signalmolekül fusioniert. Als signaltransduzierende Unter-

einheit eines CAR können die intrazytoplasmatischen Anteile unterschiedlicher aktivierender Signalketten verwendet werden. Als besonders effektiver Signalüberträger hat sich dabei die CD3 ζ -Kette erwiesen (Haynes2001). Auch die γ -Kette des hochaffinen IgE Fc-Rezeptors (Fc ϵ RI) (Teng2006) und weitere Adapterproteine aus T- und NK-Zellen, z. B. DAP10 (Zhang2006), wurden bereits eingesetzt. Der Vorteil dieser chimären Antigenrezeptoren liegt auf der Hand: Es existieren zahlreiche monoklonale Antikörper gegen TAA, die für deren Design genutzt werden können. Darüber hinaus wird die Zytotoxizität der Effektorzellen MHC-unabhängig umgelenkt. Nachteilig ist jedoch, dass nur oberflächenexprimierte Antigene als Zielstruktur in Betracht kommen und dass der scFv oder die eingebrachte Brückendomäne vom Immunsystem des Empfängers als „fremd“ erkannt werden und eine Immunreaktion induzieren können. So kam es in einigen Studien mit CAR zu pathologischen Immunreaktionen, wenn z. B. das Zielantigen nicht ausschließlich auf Tumorzellen exprimiert wurde (Lamers2006) oder wenn von CAR-modifizierten T-Zellen zu viele inflammatorische Zytokine freigesetzt wurden (Morgan2010). Bedarf an weiterführender Forschung für den sicheren Einsatz von chimären Antigenrezeptoren besteht also noch.

Bisher war man dennoch besonders bei der gentechnischen Armierung von T-Zellen sehr erfolgreich (Maher2002, Brentjens2003, Kershaw2004, Pinthus2004, Kahlon2004, Cheadle2005, Westwood2005, Hombach2006, Pule2008, Porter2011, Kochenderfer2012). Klinische Studien, die CAR-modifizierte T-Zellen für die Therapie von Gliomen einsetzen, richten sich zumeist gegen IL-13R α 2, HER2/c-neu und EphA2 (AhmedNCT01109095, FormanNCT00730613). Nach *in vitro* und *in vivo* Studien der Rosenberg-Gruppe (Morgan2012, Sampson2014) läuft momentan auch eine klinische Studie in Phase I / II, die gegen EGFRvIII gerichtet ist (RosenbergNCT01454596). Wurden NK-Zellen mit CAR transduziert, richtete sich deren umgelenkte Zytotoxizität zumeist gegen Antigene hämatologischer Tumorerkrankungen wie CD33 (Schirrmann2002, Schirrmann2005), CD20 (Müller2008) und CD19 (Imai2005). Doch wurden zumeist permanente NK-Zelllinien wie NK-92 (Uherek2002, Schirrmann2002, Schirrmann2005, Müller2008, Boissel2009, Tassev2012, Esser2012), NK3.3 (Tran1995), und NKL (Oberoi2013) modifiziert. Nur sechs Studien beschreiben den erfolgreichen Einsatz von gentechnisch veränderten primären humanen NK-Zellen (Imai2005, Kruschinski2008, Pegram2008, Altvater2009, Li2010, Shimasaki2012).

In dieser Arbeit wurde der gegen den EGFRvIII gerichtete MR1.1-Einzelkettenantikörper mit DAP12 („DNAX activating protein of 12 kDa“) verknüpft, das u. a. von den aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren NKG2C, NKp44 und verschiedenen KIR als Signaltransduktionsmolekül rekrutiert wird (Lanier1998, Campbell2004, Carr2007). DAP12 besitzt ein ITAM-Motiv („immunoreceptor tyrosine-based activation motif“), welches nach Antigenbindung und Dimerisierung phosphoryliert wird und über die Rekrutierung von ZAP70 eine Signalkaskade initiiert, die letzten Endes zur Freisetzung von zytotoxischen Granula mit Perforin und Granzymen führt.

1.7.2 Die CXCR4-SDF-1 α -Achse als Ziel einer verbesserten Migration

1.7.2.1 SDF-1 α als chemotaktischer Marker für Glioblastoma multiforme

Chemokine sind kleine, sekretierte Proteine, die u. a. Lymphozyten zu Entzündungsherden und in lymphatische Gewebe leiten können (*Springer1995, Baggiolini1998*). Typischerweise können zwei Unterfamilien unterschieden werden: CC- und CXC-Chemokine. Unter den CXC-Chemokinen ist besonders SDF-1 (CXCL12) interessant, das zunächst als prä-B-Zell-Wachstumsfaktor beschrieben wurde (*Tashiro1993, Nagasawa1994*). Es ist auf Chromosom 10q11.1 kodiert und evolutionär stark konserviert (*Shirozu1995*). Durch alternatives Spleißen des Gens entstehen drei Isoformen: SDF-1 α , SDF-1 β und SDF-1 γ (*Tashiro1993, Gleichmann2000*), wobei SDF-1 α weitaus am häufigsten verbreitet ist (*Shirozu1995*). Bleul et al. erkannten sein chemoattraktives Potential, indem sie SDF-1 α aus dem Zellkulturüberstand von Knochenmark-Stroma aufreinigten und untersuchten (*Bleul1996*). Zudem postulierten sie, dass SDF-1 α die Aktinpolymerisation stimuliert und so die Motilität von Lymphozyten, Neutrophilen und Monozyten fördert. SDF-1 wird, anders als andere Zytokine, in sehr vielen Geweben exprimiert. Im sich entwickelnden Gehirn wird es konstitutiv gebildet und übernimmt überlebenswichtige Funktionen bei der neuronalen Migration und Angiogenese (*Guyon2007, Jiang2012*). Von Gliomen wird SDF-1 α häufig überexprimiert (*Sehgal1998, Rempel2000, Bajetto2006*) und trägt durch autokrine Signale zu deren Progression bei (*Jiang2012*). Eine SDF-1 α -Expression ist klinisch relevant und korreliert mit einer signifikant verringerten progressionsfreien Zeit in Patienten mit niedriggradigem Gliom (*Salmaggi2005*).

1.7.2.2 SDF-1 α als Ziel einer gerichteten Immuntherapie

SDF-1 α bindet als Dimer an die Chemokinrezeptoren CXCR4 (*Nagasawa1996*) und CXCR7 (*Balabanian2005*). Der CXCR4-Chemokinrezeptor wurde zunächst als LESTR („leukocyte derived seven-transmembrane domain receptor“) (*Loetscher1994*) oder Fusin (*Feng1996*) beschrieben. Er ist auf Chromosom 2q21 kodiert und wird als monomerisches Heptaspan-Membranprotein und G-Protein-gekoppelter Rezeptor auf einer Vielzahl von Zellen, vor allem aber auf hämatopoietischen Zellen sowie auf Endothelien exprimiert (*Federsspiel1993*). CXCR4 ist essentiell für die Mobilisierung und zielgerichtete Migration von Stammzellen in ihre Speicher- oder Verwendungsorte bei der Organogenese oder bei Wundheilungen, fördert aber auch die Verankerung in ihrer Nische. Pathophysiologisch dient CXCR4 als Rezeptor für das GP120-Protein des Humanen Immundefizienz-Virus HIV (*Feng1996*), ist an Wachstum und Metastasierung von Tumoren – auch ins Gehirn – (*Lee2004*) sowie an Entzündungsprozessen beteiligt. Seine Hauptaufgabe liegt in der Wanderung von Lymphozyten. Die CXCR4-abhängige Chemotaxis wird nach Ligandenbindung am N-Terminus und Phosphorylierung am C-Terminus durch die PI3-Kinase vermittelt (*Ward2006*). Dies führt zur Phosphorylierung verschiedener adhäsiver Proteine wie FAK („focal adhesion kinase“) und zu zellulärer Migration (*Lee2004*). Auch eine Involvierung des MAP-Kinase-Signalwegs in die chemotaktische Regulation (*Bendall2005*) und die Aktivierung

des JAK/STAT-Signalwegs (Vila-Coro1999) wurden gezeigt. CXCR4 scheint darüber hinaus nicht nur an SDF-1 α sondern auch an extrazelluläres Ubiquitin zu binden (Saini2010). Einen schematischen Überblick über den Aufbau des Rezeptors und seine Interaktion mit SDF-1 α gibt Abbildung 4.

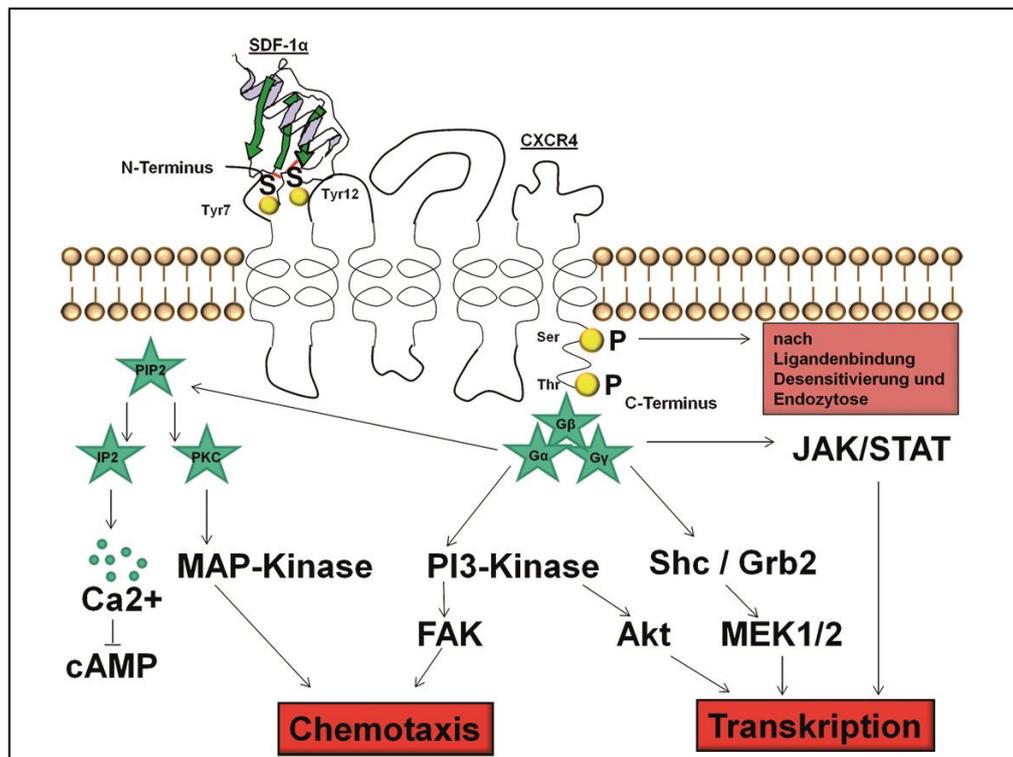


Abbildung 4 Aufbau des CXCR4-Chemokinrezeptors und seine Interaktion mit SDF-1 α . Nach Bindung an den Tyrosinrest 21 interagiert SDF-1 α in der N-terminalen Bindungstasche des CXCR4-Chemokinrezeptors mit den Tyrosinresten 7 und 12 und es werden Disulfidbrücken gebildet. Die Ligandenbindung führt zu einer Phosphorylierung des C-terminalen Proteinendes und der Rekrutierung verschiedener Signalwege, die unter anderem migratorisches Verhalten induzieren können.

Unausgereifte NK-Zellen bzw. ihre Vorläuferzellen exprimieren CXCR4 und benötigen diesen Rezeptor für eine gerichtete Wanderung hin zu Speicher- und Entwicklungsorten wie dem Knochenmark (Bernardini2008). Dortige Zellen sekretieren neben anderen wichtigen Zytokinen für die NK-Zell-Ausreifung auch SDF-1 α . Dass diese Signale immanant wichtig für eine korrekte Entwicklung von NK-Zellen sind, zeigen SDF-1 α oder CXCR4-defiziente Mäuse. Sie besitzen ebenso viele NK-Zellen wie Wildtyp-Mäuse, doch sind diese im adulten Tier kaum funktionell (Noda2011). Ausgereifte NK-Zellen tragen kaum CXCR4, auch wenn die Interaktion von SDF-1 α und CXCR4 z. B. mit der transendothelialen Diapedese und Migration von NK-Zellen in Zusammenhang gebracht wurde (Frantza2004, Fu2013).

1.8 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN

Da bei der Resektion von Glioblastomen aus dem Gehirn umliegendes Gewebe nicht großzügig entfernt werden kann, bleiben nach der operativen Entfernung oft Reste von Tumorzellen zurück. Des Weiteren findet man sehr häufig abgesiedelte Tumornester („minimal residual disease“). Diese Zellen führen in den meisten Patienten zur Wiederkehr des Hirntumors (Rezidiv). In immuntherapeutischen zellulären Verfahren sollen gentechnisch modifizierte Effektorzellen genau diese restlichen verbliebenen Zellen finden und eliminieren. Die dafür nötige Selektivität für Tumorzellen erhalten Immuneffektorzellen z. B. durch die genetische Modifikation mit einem gegen tumorassoziierte Antigene gerichteten CAR. Die effiziente Migration der Zellen hin zum Tumor ist aber mindestens ebenso wichtig für die Entfaltung ihrer spezifischen antitumoralen Eigenschaften. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung und Evaluation einer permanenten NK-Zelllinie und primären humanen NK-Zellen, die EGFRvIII-positive, SDF-1 α sekretierende Gliomzellen erkennen und abtöten können. Dies soll über die gleichzeitige stabile Expression eines CXCR4-Chemokinrezeptors und α -EGFRvIII CAR (siehe Abbildung 5) gelingen.

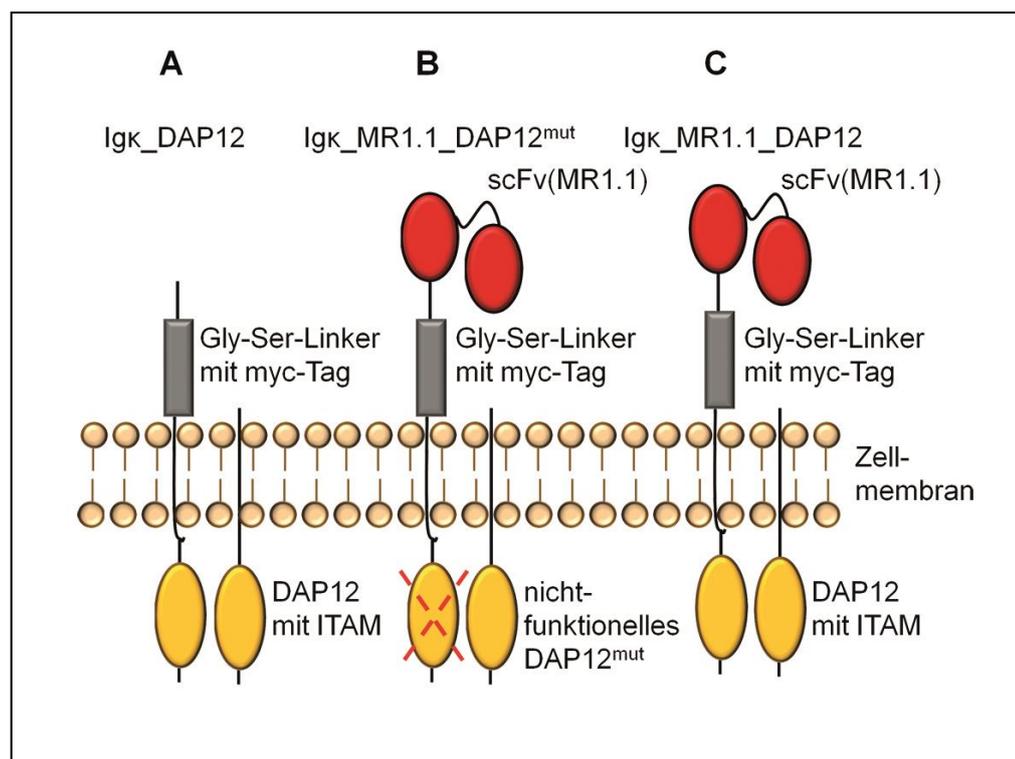


Abbildung 5 Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten chimären Antigenrezeptoren (CAR).

A) Ig κ _DAP12 ist ein Kontrollkonstrukt, das zwar über die funktionelle Signaluntereinheit, aber nicht über eine Antigenbindestruktur verfügt. B) Ig κ _MR1.1_DAP12^{mut} ist ein zweites Kontrollkonstrukt. Es besitzt die Antigenbindestruktur aus den variablen Ketten des EGFRvIII-spezifischen Antikörpers MR1.1, doch das ITAM in DAP12 wurde inaktiviert, indem zwei Tyrosinreste gegen Serin ausgetauscht wurden. So kann nach Antigenbindung keine Signalweiterleitung erfolgen. C) Ig κ _MR1.1_DAP12 ist der funktionelle chimäre Antigenrezeptor mit kompletter Signaluntereinheit und Antigenbindestruktur.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die folgenden Fragen geklärt werden:

Fördert der Einsatz des CXCR4-Chemokinrezeptors die effiziente Migration der NK-Zelllinie YTS bzw. von primären NK-Zellen hin zu SDF-1 α sekretierenden Tumoren?

Kann eine spezifische NK-Zellaktivierung über einen chimären α -EGFRvIII-CAR erreicht werden? Und ist dieses Signalereignis ausreichend, um eine zytotoxische Reaktion gegen EGFRvIII-positive Tumorzellen zu generieren?

Befähigen die eingebrachten Modifikationen NK-Zellen dazu, auch im Tiermodell gerichtet hin zu SDF-1 α sekretierenden Gliomen zu migrieren, dort ihr zytotoxisches Potential zu entfalten und Krebszellen selektiv zu erkennen und effektiv abzutöten?

Das verbesserte CXCR4-abhängige Migrationsverhalten und die Funktionalität der Antigenrezeptoren werden in der NK-Zelllinie YTS und in primären humanen NK-Zellen überprüft. Hierfür werden verschiedene *in vitro* Experimente durchgeführt, wie z. B. Transwell-Assays, die Rekrutierung von ZAP70, einer mit dem Signalweg von DAP12 assoziierten Tyrosinkinase, der Nachweis von Degranulation und IFN γ -Produktion in den NK-Zellen sowie die Bestimmung der selektiven Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber Tumorzellen. Darauf aufbauend wird mittels Tumor-Xenografts in Mäusen gezeigt, dass CXCR4-positive NK-Zellen durch SDF-1 α sekretierende Gliomzellen angelockt werden können. CAR-modifizierte NK-Zellen sind auch *in vivo* befähigt, EGFRvIII-positive Tumorzellen zu eliminieren und das inhibitorische Tumormikromilieu zu umgehen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

Alle Chemikalien bzw. Materialien wurden, soweit nicht anders genannt, von den folgenden Firmen bezogen:

- BD, Heidelberg, Deutschland
- Biochrom, Berlin, Deutschland
- Braun, Melsungen, Deutschland
- Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- CellGenix, Freiburg, Deutschland
- Clontech, Heidelberg, Deutschland
- Epicentre Biotechnologies, Oldendorf, Deutschland
- Fermentas, St. Leon-Roth, Deutschland
- Fluka, Hamburg, Deutschland
- GE Healthcare, Frankfurt am Main, Deutschland
- GIBCO, Darmstadt, Deutschland
- Invitek, Berlin, Deutschland
- Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
- Merck, Darmstadt, Deutschland
- Millipore, Schwalbach/TS, Deutschland
- Miltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Molecular Probes, Eugene, OR, USA
- Novartis, Basel, Schweiz
- InVivoGen, San Diego, CA, USA
- PAA, Cölbe, Deutschland
- Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
- Qiagen, Hilden, Deutschland
- R&D, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
- Roche, Mannheim, Deutschland
- Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland
- Serva, Heidelberg, Deutschland
- Sigma Aldrich, Hamburg, Deutschland
- Thermo Fisher, Waltham, MA, USA

2.1.1 Antibiotika

Alle Antibiotika wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei -20°C gelagert.

Tabelle 3 Übersicht verwendete Antibiotika

Name	Stammlösung	Arbeitskonzentration	Verwendung
Ampicillin	100 mg / ml	100 µg / ml	Bakterienkultivierung
Geneticin (G418)	50 mg / ml	400 µg / ml	Selektion von Zellen, Lagerung bei 4°C
Hygromycin B	50 mg / ml	150 µg / ml für YTS	Selektion von Zellen, Lagerung bei 4°C
Kanamycin	50 mg / ml	50 µg / ml	Bakterienkultivierung
Penicillin	10.000 IU / ml	100 IU / ml	Sterile Zellkultur
Puromycin	50 mg / ml	10 µg / ml für primäre NK-Zellen 15 µg / ml für YTS 20 µg / ml für U87-MG, U343-MG und HEK 293T	Selektion von Zellen
Streptomycin	10 mg / ml	100 µg / ml	Sterile Zellkultur
Zeocin	50 mg / ml	500 µg / ml für U87-MG, U343-MG und HEK 293T	Selektion von Zellen

2.1.2 Antikörper

Alle verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in den Tabellen 2 und 3 aufgeführt. Die Lagerung von Antikörpern erfolgte, je nach Herstellerangaben, bei 4°C oder -20°C. Primäre Antikörper für Western Blot (WB)-Analysen wurden mit Blockierlösung I (5% Milchpulver in TBS) verdünnt. Nur für die Antikörper gegen His und gegen phosphoZAP70 wurde Blockierlösung II (5 % BSA in TBS-T [TBS + 0,2 % Triton X-100]) verwendet. Antikörper für die Fluoreszenzzytometrie (FACS) wurden mit PBS + 1 % BSA verdünnt. Sekundärantikörper wurden in der gleichen Blockierlösung wie die entsprechenden Primärantikörper verdünnt.

Tabelle 4 Übersicht verwendete primäre Antikörper

Name	Quelle	Verdünnung / Konzentration		Referenz (Hersteller, Klon, Katalognummer)
		WB	FACS	
anti-His	Maus, monoklonal	1:2500		eBioscience (Klon HIS.H8, #14-6657)
anti-DAP12	Maus, monoklonal	1:700		R&D (Klon 406288, #MAB5240)
anti-c-myc	Maus, monoklonal	1:2500		Invitrogen (Klon 9E11, #AH0052)
anti-α-Tubulin	Maus, polyklonal	1:3000		Santa Cruz (Klon DM1A, #sc-32293)

Name	Quelle	Verdünnung / Konzentration		Referenz (Hersteller, Klon, Katalognummer)
		WB	FACS	
anti-phospho-ZAP70 (Tyr352)	Kaninchen, polyklonal	1:1500		Cell Signaling (#2701)
anti-ZAP70	Kaninchen, monoklonal	1:1500		Cell Signaling (Klon D1C10E, #3165)
anti-myc-Biotin	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon SH1-26E7.1.3, #130-092-471)
anti-EGFRvIII-His-myc			5 µg	selbst generiert, Klon MR1.1
anti-CXCR4-APC (CD184)	Ratte, IgG2b		0,5 µg	BD (Klon 2B11, #551966)
anti-TNP-PE (Isotypkontrolle)	Ratte, IgG2b		0,5 µg	BD (Klon A95-1, #553989)
anti-KLH (Isotypkontrolle)	Maus, IgG1		1 µg	BD (Klon X40, #563330)
anti-HLA-ABC-FITC	Maus, IgG1		1 µg	BD (Klon DX17, #560168)
anti-HLA-E-PE	Maus, IgG1		1 µg	eBioscience (Klon 3D12, #12-9953)
anti-FasL (CD95L)	Maus, IgG1		1 µg	Novus (Klon 14C2, #NB100-63072)
anti-FasR (CD95)	Maus, IgG1		1 µg	BD (Klon DX2, #555671)
anti-TRAIL (CD253)	Maus, IgG1		1 µg	BD (Klon RIK-2, #550515)
anti-TRAIL-R1 (CD261)	Maus, IgG1		1 µg	Acris (Klon B-N36, #AM31248PU-N)
anti-TRAIL-R2 (CD262)	Maus, IgG1		1 µg	Biolegend (Klon DJR2-2, #307302)
anti-MIC A/B	Maus, IgG2a		1 µg	R&D (Klon 159207, #MAB13001)
anti-LFA-1-PE (CD11a)	Maus, IgG1		1 µg	Immunotools (Klon MEM-25, #21270114S)
anti-FcγRIII-FITC (CD16)	Maus, IgG1		1 µg	Immunotools (Klon LNK16, #21279163S)
anti-β2-Integrin-FITC (CD18)	Maus, IgG1		1 µg	Immunotools (Klon MEM-48, #21270183S)
anti-CD28-PE	Hamster, IgG2a		1:15	Miltenyi (Klon 37.51, #130-093-180)
anti-CD56-APC	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon AF12-7H3, #130-090-843)
anti-CD3-FITC	Maus, IgG2a		1:15	Miltenyi (Klon BW264/56, #130-080-401)
anti-ILT2-PE (CD85j)	Maus, IgG2b		1 µg	BD (Klon GHI/75, #551053)

Name	Quelle	Verdünnung / Konzentration		Referenz (Hersteller, Klon, Katalognummer)
		WB	FACS	
anti-KIR2DL1-PE (CD158a)	Maus, IgM		0,5 µg	BD (Klon HP-3E4, #556063)
anti-KIR2DL2/3- PE (CD158b)	Maus, IgG2a		1:15	Miltenyi (Klon DX27, #130-092-618)
anti-KIR3DL1- FITC (CD158e)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon DX9, #103-092-568)
anti-KIR2DL5-PE (CD158f)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon UP-R1, #130-096-200)
anti-KIR3DL2- APC (CD158k)	Maus, IgG1		0,2 µg	R&D (Klon 539304, #FAB2878A)
anti-NKG2A-FITC (CD159a)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon REA110, #130-098-818)
anti-NKG2C-APC (CD159c)	Maus, IgG1		0,2 µg	R&D (Klon 134591, #FAB138A)
anti-DNAM-1-PE (CD226)	Maus, IgG1		1 µg	BD (Klon DX11, #559789)
anti-2B4-PE (CD244)	Maus, IgG1		1 µg	Beckman Coulter (Klon C1.7, #IM1608)
anti-NKG2D-PE (CD314)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon BAT221, #130-092-672)
anti-NKp46-PE (CD335)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon 9E2, #130-092-607)
anti-NKp44-PE (CD336)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon 2.29, #130-092-480)
anti-NKp30-PE (CD337)	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon AF29-4D12, #130-092-483)
Isotypkontrolle- PE / FITC	Maus, IgG1		1 µg	Immunotools (Klon PPV-06)
Isotypkontrolle- PE / FITC / APC	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon IS11-12E4.23.30)
Isotypkontrolle- PE	Maus, IgG2a		1 µg	Immunotools (Klon PPV-04)
Isotypkontrolle- PE	Maus, IgG2b		1 µg	Immunotools (Klon PLRV219)
anti-TNP-PE (Isotypkontrolle)	Maus, IgM		0,5 µg	BD (Klon G155-228, #562567)

HRP: Horse Radish Peroxidase, FITC: Fluorescein-Isothiocyant, PE: Phycoerythrin, APC: Allophycocyanin

Tabelle 5 Übersicht verwendete sekundäre Antikörper

Name	Quelle	Verdünnung / Konzentration		Referenz (Hersteller, Klon, Katalognummer)
		WB	FACS	
anti-Maus-HRP	Kaninchen, polyklonal	1:1000		Dako (#P0447)
anti-Kaninchen-HRP	Ziege, polyklonal	1:1000		Cell Signaling (#7074)
anti-Biotin-PE	Maus, IgG1		1:15	Miltenyi (Klon Bio3-18E7, #130-090-756)
anti-Maus-Cy3	Ziege (H+L)		1:50	Jackson Immunoresearch (#115-166-003)

Cy3: Indocarbocyanin, PE: Phycoerythrin, HRP: Horse Radish Peroxidase

2.1.3 Bakterienstämme

Tabelle 6 Übersicht verwendete Bakterienstämme

Name	Eigenschaften
<i>Escherichia coli</i> TOP10 F' (Invitrogen)	F' { <i>lacI^q</i> , Tn10(Tetr ^r)} <i>mcrAΔ</i> (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80 <i>lacZΔM15ΔlacX74 recA1 araD139 Δ (ara-leu)</i> 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^r) <i>endA1 nupG</i>

2.1.4 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit genutzten Chemikalien wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tabelle 7 Übersicht verwendete Chemikalien und Substanzen für molekularbiologische Arbeiten

Name	Eigenschaften / Verwendung
Agarose	DNA-Gele
Acrylamid / Bis-Solution 29:1	Protein-Gele, Lagerung bei 4°C
6-Aminocaprinsäure	Herstellung von Kathodenpuffer für Western Blots
Ammoniumperoxodisulfat, 10 %	APS, w / v, zum Vernetzen von Acrylamid, Lagerung bei 4°C
Aqua ad iniectabilia	Verdünnen von Lösungen, Lösen von DNA und RNA
Bovines Serumalbumin	BSA, Lagerung bei 4°C
Dapi	Zellkernfärbungen bei Immunfluoreszenz, Lagerung bei 4°C
Dimethylsulfoxid	DMSO, Lösen von Substanzen
Ethylendiamintetraacetat	EDTA, Herstellung von Puffern
Eisessig, 97-99 %	Herstellung von Puffern
Ethanol, 70 %	Waschen von DNA, Herstellung von Puffern
Ethidiumbromid	10 mg / ml, zum Markieren von DNA im Agarose-Gel
Imidazol	1M, Antikörperaufreinigung aus dem Zellkulturüberstand
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid	IPTG, 40 µg / ml, Blau-Weiß-Selektion, Lagerung bei -20°C

Name	Eigenschaften / Verwendung
Isopropanol, 100 %	Ausfällen von DNA
β -Mercaptoethanol	„Strippen“ von Proteinen von PVDF-Membranen
Methanol	Aktivierung der PVDF-Membran
Paraformaldehyd, 4 %	Fixieren von Zellen
Ponceau S, 1 %	Anfärben von Proteinen auf PVDF-Membranen, gelöst in 3%iger Trichloressigsäure
Sodiumdodecylsulfat	SDS, Abdecken von Protein-Ladungen bei der Gelelektrophorese
Tetramethylethyldiamin	Vernetzen von Acrylamid, Lagerung bei 4°C
Tris-Base	Herstellung von Puffern
Tris-HCl	Herstellung von Puffern
Triton X-100	Waschen von PVDF-Membranen
Tween 20	Waschen von PVDF-Membranen
X-Gal	80 μ g / ml, Blau-Weiß-Selektion, Lagerung bei -20°C

Tabelle 8 Übersicht verwendete Chemikalien und Substanzen für zellbiologische Arbeiten

Name	Eigenschaften / Verwendung
Bovines Serumalbumin	BSA, Abdecken unspezifischer Proteininteraktionen
⁵¹ Cr Radionuklid	Labeln von Zielzellen im Chromfreisetzungs-Assay
Dimethylsulfoxid	DMSO, Lösen von Substanzen, Permeabilisieren von Zellen
Ethanol, 70%	Fixieren von Zellen
Fötales Kälberserum	FKS, für Zellkulturmedien
Giemsa	Färben von Zellen beim klonalen Überlebensassay
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	HEPES, Puffersubstanz für Zellkulturmedien
Nichtessentielle Aminosäuren	NEA, für Zellkulturmedien
Paraformaldehyd, 4 %	w/ v, Fixieren von Zellen
Szintillationsflüssigkeit	Messung der Radioaktivität im Chromfreisetzungs-Assay
Triton X-100	Permeabilisieren von Zellen

2.1.5 Enzyme

Enzymen wurden bei -20°C gelagert

Tabelle 9 Übersicht verwendete Enzyme

Name	Verwendung	Hersteller
RNase A	Plasmid Mini- oder Midipräparation	Roche
RNase T1	Plasmid Mini- oder Midipräparation	Roche
Lysozym	10 mg / ml in 10 mM Tris-HCl, zum Aufbrechen von Bakterienzellwänden bei Plasmid-Minipräparation	Fluka
DreamTaq	Thermostabile DNA-Polymerase, für PCR	Thermo Fisher
FastLink Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	Epicentre Biotechnologies
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	Fermentas
Restriktionsenzyme	Klonierung	Fermentas

2.1.6 Größenstandards

Die Größenstandards wurden von Fermentas bezogen und bei -20°C gelagert.

Tabelle 10 Übersicht verwendete DNA- und Proteingrößenstandards

Name	Eigenschaften / Verwendung
Gene Ruler 1 kb plus DNA-Ladder	Nukleinsäurelängenstandard
Spectra Multicolor Broad Range Protein Standard	Proteingrößenstandard
Precision Plus Dual Color Protein Standard	Proteingrößenstandard

2.1.7 Inhibitoren

Alle Inhibitoren wurden, sofern nicht anders beschrieben, bei -20°C gelagert.

Tabelle 11 Übersicht eingesetzte Inhibitoren

Name	Eigenschaften / Verwendung	Hersteller
AMD3100 Octahydrochlorid	spezifischer CXCR4-Rezeptor-Antagonist, SL 25 mg / ml in ddH ₂ O, AL 25 µg / ml	Sigma
Aprotinin	5 µg / ml, Proteaseinhibitor	Roche
BX795	TBK1 / IKKε-Inhibitor, zur NK-Zell-Transduktion, SL 10 mM in DMSO, AL 2,5 µM	InVivoGen
Erlotinib	selektiver Inhibitor der Tyrosinkinase-Domäne des EGF-Rezeptors, SL 10 mM in DMSO, AL 10 µM	Santa Cruz
Leupeptin	10 µg / ml, Proteaseinhibitor	Roche

Name	Eigenschaften / Verwendung	Hersteller
Monensin	hemmt die Sekretierung von Vesikeln, für Degranulationsassay, SL 50 mM in Ethanol, AL 2 mM	Sigma
Phosphataseinhibitor-Cocktail 2 / 3	hemmt Serin- und Tyrosinphosphatasen, 1:100, Lagerung bei 4°C	Sigma
RNase AWAY	Oberflächenbehandlung bei RNA-Isolation, Lagerung bei RT	Molecular BioProducts

SL: Stammlösung, AL: Arbeitslösung, RT: Raumtemperatur

2.1.8 Kommerzielle Kits

Die Lagerung erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 12 Übersicht verwendete Kits

Name	Verwendung	Hersteller
Invisorb Plasmid Kit	Plasmidextraktion aus Bakterien-Midi-Kulturen	Invitex
Fast-Link DNA Ligation Kit	DNA-Ligation bei Klonierungen, Lagerung bei -20°C	Epicentre Biotechnologies
TA pCR2.1 Cloning Kit	Subklonierung von PCR-Fragmenten, Lagerung bei -20°C	Invitrogen
GeneJet Gel Extraction Kit	Elution von DNA aus Agarosegelen	Thermo Fisher
GeneJet PCR Purification Kit	Aufreinigen von DNA	Thermo Fisher
RNeasy Plus Mini Kit	RNA-Isolation aus homogenisierten Zelllysaten	Qiagen
QiaShredder	Homogenisierung von Zelllysaten bei RNA-Isolation	Qiagen
RevertAid cDNA Synthesis Kit	Reverse Transkription von RNA in cDNA	Thermo Fisher
DreamTaq Kit	Polymerase für PCR samt Puffer und dNTPs, Lagerung bei -20°C	Thermo Fisher
NK Cell Isolation Kit	Isolation von NK-Zellen aus peripherem Blut, Lagerung bei 4°C	Miltenyi
NK Cell Activation / Expansion Kit	Aktivierung und Expansion von isolierten NK-Zellen, Zytokin-Mix, Lagerung bei 4°C	Miltenyi
Human CXCL12/SDF-1 DuoSet ELISA	Bestimmung von SDF-1 α im Zellkulturüberstand, Lagerung bei 4°C	R&D
Human INF γ ELISA Set	Bestimmung von INF γ im Zellkulturüberstand, Lagerung bei 4°C	BD
Pierce BCA Protein Assay Kit	Proteinbestimmung in Zelllysaten	Thermo Fisher
GeneJET RNA Cleanup and Concentration Kit	Aufreinigung von RNA	Thermo Fisher

Name	Verwendung	Hersteller
FastAP Kit	Dephosphorylierung der Enden von linearisierten DNA-Vektoren bei Klonierungen samt Puffer, Lagerung bei -20°C	Fermentas
Dialysemembran Spectra Por MMCO: 3,500	Antikörperaufreinigung aus dem Zellkulturüberstand, Lagerung bei 4°C	Carl Roth
DNase I Kit	RNA-Isolation, zum Entfernen von genomischer DNA, samt Puffer, Lagerung bei 4°C	Qiagen
QIAamp DNA Mini and Blood Mini	DNA-Isolation aus Zelllysaten	Qiagen

2.1.9 Lösungen und Puffer

Die Lagerung aller Puffer und Lösungen erfolgte, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur (RT).

Tabelle 13 Übersicht verwendete Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA

Name	Zusammensetzung und Verwendung
6 x Ladepuffer (Fermentas)	Auftragen von DNA auf das DNA-Gel, Lagerung bei 4°C
Natriumacetat	3 M gelöst in ddH ₂ O
STET-Puffer	0,1 M NaCl 10 mM Tris / Cl (pH 8,0) 1 mM EDTA (pH 8,0) 5 % Triton X-100
50x TAE-Puffer	2 M Tris-Base 5,7 % (v / v) Eisessig 50 mM EDTA (pH 8,0)
TE-Puffer	10 mM Tris / Cl 1 mM EDTA zum Einstellen auf pH 7,5 - 8,0

Tabelle 14 Übersicht verwendete Puffer und Lösungen für Herstellung kompetenter Bakterien

Name	Zusammensetzung
TFB1-Puffer	100 mM RbCl ₂ 30 mM MnCl ₂ 10 mM CaCl ₂ 15 % Glycerin Lagerung bei 4°C
TFB2-Puffer	10 mM Na-3-[N-Morpholino]-Propansulfonsäure 75 mM CaCl ₂ 10 mM RbCl ₂ 15 % Glycerin Lagerung bei 4°C

Tabelle 15 Übersicht verwendete Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Analysen

Name	Zusammensetzung und Verwendung
Anodenpuffer I	300 mM Tris-Base 20 % Methanol (v / v)
Anodenpuffer II	25 mM Tris-Base 20 % Methanol (v / v)
Blockierlösung I	5 % Milchpulver in 1 x TBS
Blockierlösung II	5 % BSA in 1 x TBS-T
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base 40 mM 6-Aminocaprinsäure 20 % Methanol (v / v)
2 x Laemmli Sample Buffer	Denaturierung von Proteinen und Auftragen auf Protein-Gele, Lagerung bei -20°C
Luminata Forte Western HRP Substrate (Millipore)	Detektion von Proteinen auf PVDF-Membranen
RIPA-Lysepuffer	10 mM Tris-HCl 140 mM NaCl 0,025 % NaN ₃ (v / v) 1 % Triton X-100 pH 8,0 Lagerung bei 4°C
Sammelgel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 6,8) Lagerung bei 4°C
10 x SDS-Laufpuffer	14,4 % Glycin 1 % SDS 6 % Tris-Base
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 7,0) 2 % SDS vor Verwendung Zugabe von 350 µl β-Mercaptoethanol
10 x TBS	10 mM Tris-HCl (pH 7,5) 150 mM NaCl
TBS-T	1 x TBS 0,2 % Triton X-100 (v / v)
TBS-TT	1 x TBS 0,05 % Tween 20 (v / v) 0,2 % Triton X-100 (v / v)
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,8) Lagerung bei 4°C

Tabelle 16 Übersicht verwendete Lösungen und Puffer für zellbiologische Arbeiten

Name	Zusammensetzung und Verwendung
Biocoll	Ficoll Separating Solution, zur NK-Zell-Isolation, Lagerung bei 4°C
Blockierlösung	PBS und 1 % BSA (w / v), für Antikörperfärbungen, Lagerung bei 4°C
Natriumbutyrat	Virusproduktion, SL 500 mM in PBS, AL 10 mM, 0,2 µm sterilfiltriert
PBS	Phosphate Buffered Saline, zum Waschen von Zellen, ohne Mg ²⁺ und Ca ²⁺ (pH 7,4)
Permeabilisierungslösung	intrazelluläre Färbungen, 1 % BSA (w / v) und 0,3 % Triton X-100 (v / v) in PBS, Lagerung bei 4°C
Polybren	Virusproduktion, AL 8 mg / ml, 0,2 µm sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Polyethylenimin-Lösung	PEI, Transfektion, SL 100 mg / ml, AL 1 mg / ml, 0,45 µM sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C
Trypanblau	Vitalfarbstoff zur Zellzählung
Trypsin / EDTA	Ablösen von adhärenen Zellen, SL 0,25 %, AL 0,5 %, Lagerung bei 4°C

SL: Stammlösung, AL: Arbeitslösung

2.1.10 Medien

Die Lagerung aller Medien erfolgte bei 4°C.

Tabelle 17 Übersicht verwendete Bakterienkultur-Medien

Name	Inhaltsangabe
Luria-Bertani-(LB)-Medium (flüssig)	1,0 % (w / v) Bacto Trypton (pH 7,2) 0,5 % (w / v) Bacto Yeast Hefe-Extrakt 1,0 % (w / v) NaCl pH 7.0
LB-Agar (fest)	LB-Medium und zusätzlich 1,5 % Bacto Agar eventuell Zugabe von Antibiotikum
2 x YT-Medium	8 g Bacto Trypton 5 g Bacto Yeast Hefe-Extrakt 5 g NaCl ad. 490 ml ddH ₂ O mit NaOH einstellen auf pH 7,5 autoklavieren und kurz vor Gebrauch zugeben: 20 mM MgSO ₄ 10 mM KCl

Tabelle 18 Übersicht eingesetzte Medien für die Zellkultur

Name	Inhaltsangabe
DMEM (ohne)	Dulbecco's Modified Eagle Medium (<i>Dulbecco1959</i>) mit Glukose (4,5 g / l), Natriumpyruvat und L-Glutamin
DMEM (komplett)	DMEM (ohne) und zusätzlich: 10 % fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert 10 mM HEPES 100 IU / ml Penicillin 0,1 mg / ml Streptomycin
DMEM (15%)	DMEM (ohne) und zusätzlich: 15 % fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert 10 mM HEPES 100 IU / ml Penicillin 0,1 mg / ml Streptomycin
DMEM (G418)	DMEM (komplett) und zusätzlich: 400 µg / ml Geneticin (G418)
DMEM (Erlotinib)	DMEM (komplett) und zusätzlich: 10 µM Erlotinib (gelöst in DMSO)
BME (komplett)	Basal Medium Eagle und zusätzlich: 10 % fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert 10 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 1 x MEM NEA 100 IU / ml Penicillin 0,1 mg / ml Streptomycin
RPMI-1640 (ohne)	Roswell Park Memorial Institute Medium
RPMI-1640 (komplett)	RPMI-1640 (ohne) und zusätzlich: 10 % fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert 10 mM HEPES 2 mM L-Glutamin 100 IU / ml Penicillin 0,1 mg / ml Streptomycin
CellGro (ohne)	CellGro Good Manufacturing Protocol Stem Cell Growth Medium
CellGro (komplett)	CellGro (ohne) und zusätzlich: 10 % fötales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert 1000 IU / ml Proleukin S (IL-2) 20 ng / ml IL-21
Einfriermedium	10 % DMSO in hitzeinaktiviertem FKS
Kryomedium	Einbetten von Geweben und Tumorproben
Eindeckelmedium	Vectashield Mounting Medium (Vector), für immunhistochemische Untersuchungen

2.1.11 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Biofins bezogen und bei -20°C gelagert.

Tabelle 19 Übersicht verwendete Oligonukleotide für Klonierungen und PCR

Name	5' - 3' Sequenz	Eigenschaften
MECL1-GCA1_for	GCTTACTCCACCTCCATAGCC	21 bp, Tm 58°C, Überprüfung von cDNA auf gDNA-Kontamination nach Reverser Transkription
MECL1-YS1_rev	CTGGCGGTGCTAGAAGACC	19 bp, Tm 55°C, Überprüfung von cDNA auf gDNA-Kontamination nach Reverser Transkription
CXCR4_for	TTTTTaccggtgccaccATGGAGGGGATCA GTATATACAC	40 bp, Tm 72,5°C, Umklonieren von CXCR4 in pHATtrick-puroR, mit AgeI-Schnittstelle
CXCR4_rev	AAAAGcgggccgTccGCTGGAGTGAAA ACTTGAAGACTCAGACTCAGTGGAA	55 bp, Tm > 75°C, Umklonieren von CXCR4 in pHATtrick-puroR, mit NotI-Schnittstelle
Igκ_MR1.1_for	TTTTTaccggtgccaccATGGAGACAGACA CACTCCTGCTATGGGTAAGTCTGCTCT GGGTTCCAGGT	68 bp, Tm > 75°C, Einsetzen von MR1.1 (C-Terminus Teil I mit Igκ-Leaderpeptid und Start-ATG) in pHATtrick-puroR- Igκ_DAP12, mit AgeI-Schnittstelle
MR1.1_for	TTTTTGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAG GTTCCACTGGTGACGCGCAGGTGAAAC TGCAGCAGTCTGGGG	69 bp, Tm > 75°C, Einsetzen von MR1.1 (C-Terminus Teil II) in pHATtrick-puroR-Igκ_DAP12
MR1.1_rev	AAAAGcatgcAGATCCTCCAGATCCTCCG CTTCCAGCTTGGTGCCATCACCGAAT GTAAGAGGCA	66 bp, Tm > 75°C, Einsetzen von MR1.1 (N-Terminus mit Glycin-Serin-Linker) in pHATtrick-puroR-Igκ_DAP12, mit SphI-Schnittstelle
HygroR_for	TTTTTggtaccgccaccGATAGATCCGGAA AGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGT	55 bp, Tm > 75°C, Ersetzen von Puromycin-Resistenzgen durch Hygromycin-Resistenzgen in pHATtrick-puroR-CXCR4, mit KpnI-Schnittstelle
HygroR_rev	AAAAAgatataCTATTCCTTTGCCCTCGG ACGAGTGCTGGGGCGTCCGTTCCAC	55 bp, Tm > 75°C, Ersetzen von Puromycin-Resistenzgen durch Hygromycin-Resistenzgen in pHATtrick-puroR-CXCR4, mit EcoRV-Schnittstelle

Tabelle 20 Übersicht verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen

Name	5' – 3' Sequenz	Eigenschaften
M13_rev	GGAAACAGCTATGACCATG	19 bp, Überprüfung von Inserts in pCR2.1
T7prom	TAATACGACTCACTATAGGG	20 bp, Überprüfung von Inserts in pCR2.1
EGFRvIII_for	ATGCGACCCTCCGGGACGG	19 bp, Überprüfung von EGFRvIII
EGFRvIII_rev	ACCTTCTGGGATCCAGAGTCC	21 bp, Überprüfung von EGFRvIII
p6NST1_seq_for	GGGGGTACAGTGCAGGGG	18 bp, Überprüfung von Inserts in pHATtrick
p6NST1_seq_rev	GACAAGGCGCGCCTGGCCAGCT	22 bp, Überprüfung von Inserts in pHATtrick
MCS2_rev	CCGCATGTTAGAAGACTTCCTCTGCCC TC	29 bp, Überprüfung von Inserts in pHATtrick
MR1.1_for	CAGGTGAAACTGCAGCAG	18 bp, Überprüfung von MR1.1
MR1.1_rev	GGCACCAAGCTGGAAA	16 bp, Überprüfung von MR1.1

2.1.12 Plasmide

Die Plasmide wurden, sofern nicht anders beschrieben, von Prof. Dr. Achim Temme (Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Sektion Experimentelle Neurochirurgie und Tumorimmunologie, Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ der TU Dresden) zur Verfügung gestellt. Vor deren Verwendung bzw. nach Klonierungen wurde die Basenabfolge über Kontrollverdau und Sequenzierung geprüft.

Tabelle 21 Übersicht verwendete Plasmide

Name	Eigenschaften
pcz-VSV-G	Expressionsvektor mit dem Env-Glykoprotein G des Vesicular Stomatitis Virus (D. Lindemann) ¹
pCD/NL-BH	Expressionsvektor für Gag-Pol-Polyprotein von HIV-1 (D. Lindemann)
pCR2.1	Klonierungsvektor aus TA Cloning Kit
MFGS-CXCR4	CXCR4-Chemokinrezeptor (S. Brenner) ²
p6NST50-SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR	lentiviraler Expressionsvektor für sekretierbares Chemokin SDF-1 α , mit IRES_EGFP_ZeoR (M. Cartellieri) ³
pHATtrick-EGFP	lentiviraler Expressionsvektor mit Multiple Cloning Site, proteolytischer Spaltstelle und EGFP-Marker

¹ TU Dresden, Institut für Virologie

² Carl-Gustav-Carus-Universitätsklinikum der TU Dresden, Kinderklinik

³ TU Dresden, Institut für Immunologie

Name	Eigenschaften
pHATtrick-puroR	lentiviraler Expressionsvektor mit Multiple Cloning Site, proteolytischer Spaltstelle und Puromycin-Resistenz
pHATtrick-puroR-Igκ_DAP12	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, mit Igκ-Leaderpeptid und intrazellulärer Signaluntereinheit DAP12
pHATtrick-EGFP-Igκ_DAP12 ^{mut}	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-EGFP, mit Igκ-Leaderpeptid und nicht funktioneller intrazellulärer Signaluntereinheit DAP12 (2 x Tyr ersetzt durch 2 x Ser in ITAM)
pHATtrick-puroR-Igκ_DAP12 ^{mut}	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, mit Igκ-Leaderpeptid und nicht funktioneller intrazellulärer Signaluntereinheit DAP12 (2 x Tyr ersetzt durch 2 x Ser in ITAM)
pSeqTag-MR1.1-BAP	spezifischer scFv-Antikörper gegen EGFRvIII, mit His-Tag zur Aufreinigung und myc-Tag zur Detektion (I. Pastan) ⁴
pBluescript_EGFRvIII	Epidermal growth factor receptor Variante III, von MWG synthetisiert
p6NST61-DsRed-Express2	lentiviraler Expressionsvektor für rot fluoreszierendes Protein (D. Lindemann)

Tabelle 22 Übersicht im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide

Name	Eigenschaften
pHATtrick-EGFP-Igκ_MR1.1_DAP12	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-EGFP, mit Igκ-Leaderpeptid und funktionellem scFv(MR1.1)-DAP12-CAR
pHATtrick-puroR-Igκ_MR1.1_DAP12	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, mit Igκ-Leaderpeptid und funktionellem scFv(MR1.1)-DAP12 CAR
pHATtrick-EGFP-Igκ_MR1.1_DAP12 ^{mut}	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-EGFP, Igκ-Leaderpeptid und nichtfunktionellem scFv(MR1.1)-DAP12 ^{mut} CAR
pHATtrick-puroR-Igκ_MR1.1_DAP12 ^{mut}	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, Igκ-Leaderpeptid und nichtfunktionellem scFv(MR1.1)-DAP12 ^{mut} CAR
pHATtrick-hygroR-CXCR4	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, mit CXCR4-Chemokinrezeptor und Hygromycin-Resistenz
pHATtrick-puroR-CXCR4	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, mit CXCR4-Chemokinrezeptor
pHATtrick-puroR-EGFRvIII	lentiviraler Expressionsvektor, basierend auf pHATtrick-puroR, mit EGFRvIII

⁴ Cellular and Molecular Medicine, La Jolla University, California, USA

2.1.13 Software

Tabelle 23 Übersicht verwendete Software

Name	Verwendung	Hersteller
Adobe Photoshop CS5	Bildbearbeitung, Grafiken	Adobe Systems
ApE A plasmid editor	<i>in silicio</i> Klonierungen	Biology Labs, Utah, USA
Clone Manager 9	<i>in silicio</i> Klonierungen	Sci-Ed Software
Fast PCR	Primer-Überprüfung	Primer Digital
Flow Jo v10	Auswertung von FACS-Daten	Tree Star
GraphPad Prism 6	Statistische Auswertung und Grafiken	GraphPad
Image J 1.41	Densitometrie und Z-Stacks	NIH, USA
Miltenyi MACSQuant	Software des MACSQuant	Miltenyi
Zotero	Literaturverwaltung	Centre for History and New Media, George Mason University, USA

2.1.14 Verbrauchsmittel

Es werden nur einige wichtige Verbrauchsmittel aufgeführt. Verbrauchsmittel für den täglichen Gebrauch stammten von Eppendorf, Greiner, Nunc und anderen einschlägigen Produzenten von Laborbedarf.

Tabelle 24 Übersicht Verbrauchsmittel

Name	Verwendung	Hersteller
Filterpapier	Western Blot	Whatman
Fluorotrans Transfer Membran (PVDF)	Western Blot	Whatman
CoStar 24-Well-Transwell with Polycarbonate Membrane Insert	Boyden-Kammer-Assay, mit Porengröße 8 µm für YTS oder 3 µm für primäre NK-Zellen	Corning
Rundbodenplatten 96-Well Culture Cluster (Polystyrene)	Chromfreisetzungs-Assay	Costar
Szintillations-Platten für 1450 MicroBeta (PET)	Chromfreisetzungs-Assay, Detektion der Radioaktivität	Perkin Elmer
Spitzbodenplatten 96-Well	fluoreszenzzytometrische Antikörperfärbungen	Nunc
Objektträger, "ready-to-use", 76x26 mm	Aufziehen von Kryoschnitten für immunhistologische Untersuchungen	StarFrost

2.1.15 Zelllinien

Die Zelllinien wurden, sofern nicht besonders erwähnt, von Prof. Dr. Achim Temme zur Verfügung gestellt.

Tabelle 25 Übersicht verwendete Zellen und Zelllinien

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
HEK 293T	DMEM (komplett)	(<i>Graham1977</i>), (<i>DuBridge1987</i>), ATCC CRL-1573	immortalisiertes humanes embryonales Nierenepithel mit stabil integriertem großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40)
HEK 293T ^{EGFRvIII}	DMEM (komplett)	im Rahmen dieser Arbeit generiert	stabile Expression des EGFRvIII nach Puromycin-Selektion
HEK 293T ^{MR1.1}	DMEM (komplett)	im Rahmen dieser Arbeit generiert	sekretieren nach transienter Transfektion scFv(MR1.1) in den Zellkulturüberstand
U87-MG	BME (komplett)	(<i>Ponten1966</i>), ATCC HTB-14	humane Glioblastomzelllinie (WHO IV)
U87-MG ^{EGFRvIII}	DMEM (G418)	(<i>Nishikawa1994</i>), zur Verfügung gestellt von Dr. F. Funari ⁵	Transduktion mit EGFRvIII, wird unter Geneticin-Druck exprimiert
U87-MG ^{EGFRvIII} / EGFP	DMEM (G418)	im Rahmen dieser Arbeit generiert	stabile Expression von EGFRvIII und EGFP
U87-MG ^{EGFRvIII} / SDF-1 α	DMEM (G418)	im Rahmen dieser Arbeit generiert	zusätzlich zu EGFRvIII-Expression wird humanes SDF-1 α ins Medium sekretiert, mit IRES_EGFP_ZeoR
U343-MG	BME (komplett)	(<i>Dirks1997</i>)	humane Glioblastomzelllinie (WHO IV)
U343-MG ^{EGFRvIII}	BME (komplett)	im Rahmen dieser Arbeit generiert	stabile Expression des EGFRvIII nach Puromycin-Selektion
BS153	DMEM (komplett)	(<i>Jones2001</i>), zur Verfügung gestellt von Dr. A. Schulte und Dr. K. Lamszus ⁶	primäres Glioblastom (WHO IV)
BS153 ^{resE}	DMEM (Erlotinib)	(<i>Schulte2013</i>), zur Verfügung gestellt von Dr. A. Schulte und Dr. K. Lamszus	überexprimiert unter Erlotinib-Druck EGFRvIII

⁵ Cellular and Molecular Medicine, La Jolla University, California, USA

⁶ Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Name	Medium	Referenz	Eigenschaften
K562	RPMI-1640 (komplett)	(<i>Lozzio1975</i>), ATCC CCL-243	HLA-negative Leukämie-Zellen (CML), Suspension
YTS	RPMI-1640 (komplett)	Zur Verfügung gestellt von Dr. R. Galandrini ⁷	humane NK-Zelllinie, Suspension
Natürliche Killerzellen (NK)	CellGro (komplett)		humane primäre Immunzellen, isoliert aus peripherem Blut von drei verschiedenen gesunden Spendern, Suspension
HT1080	DMEM (komplett)	(<i>Rasheed1974</i>), ATCC CCL-121	humane Bindegewebszellen eines Fibrosarkoms

2.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN

2.2.1 Anzucht von Bakterien

Die Kultivierung von TOP10 F' *Escherichia coli* (siehe Tabelle 6) erfolgte entweder auf LB-Agarplatten oder als Suspensionskultur in flüssigem LB-Medium. Die Zusammensetzung der Medien ist Tabelle 17 zu entnehmen. Zur Selektion von Transformanten wurden den Medien die entsprechenden Antibiotika zugesetzt (siehe Tabelle 3).

2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde die Calciumchlorid / Rubidiumchlorid-Methode (*Hanahan1983*) angewandt. Eine Einzelkolonie von TOP10 F' *E. coli* wurde mit einem sterilen Holzstäbchen gepickt und in 2 ml 2 x YT-Medium bei 37°C und 180 rpm vorkultiviert. Nach 12 – 16 h erfolgte eine 1:100 Verdünnung der Vorkultur in 2 x YT-Medium. Die Bakterien wurden circa 1,5 – 4 h bis zum Beginn der exponentiellen Wachstumsphase (optische Dichte (OD₆₀₀) von 0,5) bei 37°C weiterkultiviert. Mit Erreichen dieser optischen Dichte wurde die Bakteriensuspension für 5 min auf 4°C abgekühlt, dann auf zwei 50 ml-Greiner-Röhrchen verteilt und abzentrifugiert (3.500 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpellets in je 10 ml Transformationspuffer 1 (TFB1) resuspendiert. Nach weiteren 10 min Inkubation bei 4°C erfolgte eine erneute Zentrifugation (5.000 rpm, 5 min, 4°C). Die Pellets wurden in je 2 ml Transformationspuffer 2 (TFB2) aufgenommen, in 50 µl Aliquots aufgeteilt und bei -80°C gelagert. Die Zusammensetzung der Transformationspuffer findet sich in Tabelle 14 und die verwendeten Medien in Tabelle 17.

⁷ Universität La Sapienza, Rom, Italien

2.2.3 Transformation von Bakterien

Unter Transformation wird die Aufnahme von Plasmid-DNA durch prokaryotische kompetente Zellen verstanden. Es soll eine Amplifikation der Plasmid-DNA durch die Bakterien erreicht werden. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *E. coli*-Stamm TOP10 F' besitzt eine hohe Transformationseffizienz. Während einer 15-minütigen Inkubation von 50 µl einer Suspension kompetenter Bakterien mit DNA-Lösung (z. B. einem Ligationsansatz, siehe Kapitel 2.3.1.5) bei 4°C lagerte sich Plasmid-DNA an die Bakterienzellwände an. Ein anschließender Hitzeschock von 42°C ließ die Bakterien die DNA aufnehmen. Sofort danach wurden die Bakterien in 950 µl LB-Medium ohne Antibiotika resuspendiert, etwa 30 min bei 37°C und 400 rpm im Thermomixer inkubiert und anschließend auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten ausgestrichen oder in LB-Flüssigmedium weiterkultiviert.

2.2.4 Blau-Weiß-Selektion

Durch Blau-Weiß-Selektion wurden *E. coli*-Klone identifiziert, die erfolgreich mit einem Insert tragenden pCR2.1-Vektor transformiert wurden. Der im Rahmen dieser Arbeit genutzte *E. coli*-Stamm Top10 F' besitzt den 3'-Abschnitt des lacZ'-Gens im Genom, welcher für den C-terminalen Teil von β-Galaktosidase kodiert. pCR2.1 kodiert für den 5'-Abschnitt des Gens. Die Klonierung von DNA-Fragmenten (siehe Kapitel 2.3.1) in den Vektor erfolgte über eine multiple Klonierungsstelle (MCS, „multiple cloning site“). Durch Einführung eines Inserts wird der offene Leserahmen (ORF, „open reading frame“) für die N-terminale Untereinheit der β-Galaktosidase zerstört.

Auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten wurden 80 µg / ml des Laktose-Analogons X-Gal und 40 µg / ml des Induktors IPTG mit einem Drigalski-Spatel aufgebracht. β-Galaktosidase baut farbloses X-Gal zu dunkelblauem 5-Brom-4-Chlor-Indigo ab. Auf diese Platten ausplattierte Bakterien, die den Leervektor aufgenommen hatten, bildeten das funktionelle Enzym und wuchsen daher in blauen Kolonien, während hingegen Bakterien, die den pCR2.1 samt Insert trugen, weiße Kolonien bildeten.

2.2.5 Plasmid-DNA-Präparation

2.2.5.1 Mini-DNA-Präparation

Um nach Transformation positive Klone zu finden und Plasmide im kleinen Maßstab aus Bakterienkulturen zu isolieren, wurde eine modifizierte Methode nach Holmes und Quigley (Holmes1981) genutzt. Einzelkolonien wurden mit einem sterilen Holzstäbchen von LB-Agarplatten gepickt und in Greiner-Röhrchen mit 5 ml ampicillinhaltigem LB-Medium überführt. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht bei 37°C und 180 rpm im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Bakteriensuspension steril in Eppendorf-Tubes aufgenommen und pelletiert (12.000 rpm, 1 min, RT). Die Gewinnung der Plasmid-

DNA beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. STET-Puffer und eine Inkubation mit Lysozym für 40 sek bei 95°C brachen die Zellwände auf, ein anschließender Zentrifugationsschritt (12.000 rpm, 10 min, RT) trennte die DNA im wässrigen Überstand von Zelltrümmern. Durch Zugabe von Natriumacetat wurde der pH-Wert der Lösung rapide gesenkt. Dies führte zur schnellen Renaturierung von Plasmid-DNA, während die größere genomische DNA nur langsam renaturierte. Eine anschließende 5-minütige Inkubation mit Isopropanol fällte die bereits renaturierte Plasmid-DNA aus. Die pelletierte DNA (12.000 rpm, 5 min, 4°C) wurde mit Ethanol gewaschen, d. h. von Salz- und Pufferresten befreit, erneut zentrifugiert (12.000 rpm, 5 min, 4°C), bei 50°C im Thermomixer für 10 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl ddH₂O resuspendiert. Durch Zugabe einer RNase-Lösung (RNase A und RNase T1) wurden RNA-Verunreinigungen der Plasmid-DNA entfernt und die Reinheit der DNA-Lösung erhöht. So isolierte DNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.2 Midi-DNA-Präparation

Für die Isolierung größerer und reinerer DNA-Mengen wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben eine Kultur von 100 µl Bakteriensuspension in 100 ml ampicillinhaltigem LB-Medium angesetzt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakteriensuspension in 50 ml-Greiner-Röhrchen überführt und für 10 min mit 6.000 rpm bei RT pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet mit dem Invisorb Plasmid Midi Kit (Invitek) nach Herstellerangaben behandelt. Das Prinzip dieses Kits beruht ebenfalls auf der alkalischen Lyse, die isolierte DNA ist durch Nutzung von Anionen-Austauscher-Säulchen jedoch sauberer als bei der Mini-Präparation. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde in 600 µl Elutionspuffer (im Kit enthalten) aufgenommen und ebenfalls bei -20°C aufbewahrt.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

Alle gentechnischen Arbeiten wurden im Rahmen der Gentechnik-Verordnung (Aktenzeichen: 55-8811.72/67): S2 Anlage und S2-Projekte "Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie", genehmigt am 06.05.2009 durch das Sächsische Staatsministerium für Umwelt und Landwirtschaft, durchgeführt.

2.3.1 Klonierung

2.3.1.1 Enzymatischer Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen des Typ 2 wurden verwendet, um Plasmide zu linearisieren, DNA-Fragmente für eine Klonierung zu isolieren (präparativer Verdau) oder um die Identität des Plasmids anhand der charakteristischen DNA-Banden nach Restriktion in einem Agarosegel zu überprüfen (analytischer Verdau). Alle Restriktionsenzyme und ihre Puffer stammen von Fermentas. Die Reaktionsbedingungen wurden stets nach den Angaben des Herstellers gewählt. Die Restriktionsansätze wurden für jeweils 1 h bei der

erforderlichen Temperatur inkubiert und danach die Enzyme für 5 min hitzeinaktiviert. Anschließend wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Kapitel 2.3.1.3) die DNA analytischer Restriktionsansätze auf ihre Spezifität überprüft, oder die gewünschten DNA-Fragmente präparativer Restriktionsansätze mit einem Skalpell ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 2.3.1.4). Ein typischer Restriktionsansatz ist in Tabelle 26 zusammengefasst.

Tabelle 26 Standard-Restriktionsansatz

Substanz	Eingesetztes Volumen oder Konzentration
DNA	2 µg
Restriktionsenzym (10 IU / ml)	1 µl
10 x Puffer	2 µl
ddH ₂ O	ad. 20 µl

Eine internationale Enzymeinheit (1 IU) wird definiert als die Menge des Enzyms, die benötigt wird, um unter optimalen Bedingungen 1 µg Substrat-DNA in 1 h zu verdauen.

2.3.1.2 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatresten

Um zu verhindern, dass ein Vektor nach erfolgter Restriktion über teil- oder vollkompatible Enden mit sich selbst ligiert, wurde dieser mit thermosensitiver alkalischer Phosphatase (FastAP, Fermentas) behandelt. Dieses Enzym dephosphoryliert DNA-Stränge am 5'- und 3'- Ende und verhindert somit durch Entfernung der aktivierten endständigen Phosphatgruppen eine Religation. Ein in Tabelle 27 beschriebener Standard-Ansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Phosphatase für 5 min bei 75°C hitzeinaktiviert.

Tabelle 27 Standard-Dephosphorylierungsansatz

Substanz	Eingesetztes Volumen oder Konzentration
lineare DNA	10 µl
FastAP (1000 IU / ml)	1 µl (1 IU)
10 x Puffer	2 µl
ddH ₂ O	ad. 20 µl

Die so dephosphorylierte Vektor-DNA wurde direkt für weitere Schritte (z. B. Ligation mit DNA-Fragmenten, siehe Kapitel 2.3.1.5) verwendet. Ein Aufreinigungsschritt war laut Herstellerangaben nicht notwendig.

2.3.1.3 Agarosegelelektrophorese

Linearisierte DNA-Fragmente können aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Dabei wandern die Fragmente in Abhängigkeit von ihrer Größe unterschiedlich schnell zur Anode. Die Porengröße des Gels, die den Auftrennungsbereich bestimmt, wird über die Agarosekonzentration eingestellt. Meist wurden 1%ige Agarosegele

verwendet. Dafür wurde die entsprechende Menge Agarose in 1 x TAE-Puffer durch Kochen in einer Mikrowelle gelöst, anschließend auf etwa 55°C abgekühlt und in einen horizontalen Gelschlitten gegossen. Die mit 6 x Ladepuffer versetzten Proben und der Nukleinsäurelängenstandard (Gene Ruler 1kb plus DNA Ladder, Fermentas) wurden in Geltaschen gefüllt, die durch das Einsetzen eines Kammes vor Polymerisation der Agarose entstanden waren. Die Gelkammer wurde mit 1 x TAE-Puffer gefüllt und die Proben durch Anlegen von 7 V pro 1 cm Elektrodenabstand aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele in einem Wasserbad mit Ethidiumbromid ($c = 0,2 \mu\text{g} / \text{ml}$) für circa 10 min inkubiert. Anschließend wurden die aufgetrennten DNA-Fragmente im UV-Transilluminator analysiert.

2.3.1.4 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Unter UV-Beleuchtung wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, und anschließend mit dem GeneJet Gel Extraction Kit von Thermo Fisher aus der Agarose aufgereinigt und isoliert. Die DNA wurde in ddH₂O aufgenommen und bei -20°C gelagert oder direkt für weitere Klonierungsschritte verwendet.

2.3.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren

Die Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierten Vektoren erfolgte mit Hilfe einer FastLink Ligase (Epicentre Biotechnologies) in einem Standard-Ligationsansatz. Die Ligase katalysiert in Gegenwart von Mg²⁺ Ionen und unter ATP-Verbrauch die Bildung von Diesterbrücken zwischen DNA-Strangenden über deren 5'-Phosphatgruppen und 3'-Hydroxylreste. Für eine Ligation wurden DNA-Fragment und linearisierter Vektor im Verhältnis 5:1 mit der FastLink-Ligase und dem entsprechenden Puffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zusammensetzung eines typischen Ligationsansatzes ist in Tabelle 28 aufgelistet.

Tabelle 28 Standard-Ligationsansatz

Substanz	Eingesetztes Volumen oder Konzentration
Insert (PCR-Fragment / DNA)	4 μl
Vektor-DNA	1 μl
10 x Reaktionspuffer	2 μl
10 mM ATP	0,75 μl
FastLink-Ligase	0,75 μl
ddH ₂ O	ad. 20 μl

Im Anschluss an die Ligation wurde der Ansatz für die Transformation kompetenter Bakterien gemäß Kapitel 2.2.3 verwendet.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren am Photometer

Nach durchgeführter DNA- oder RNA-Präparation wurde der Nukleinsäuregehalt durch Bestimmung der optischen Dichte (OD) am Photometer (Synergy 2 Multi Plate Reader, Biotek) bestimmt. Das Prinzip der Konzentrationsmessung beruht auf einer Anregung der nukleinsäurehaltigen Lösung bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Daraus kann sowohl die Konzentration als auch der Reinheitsgrad der Lösung berechnet werden. Eine OD₂₆₀ von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg / ml Doppelstrang-DNA bzw. 40 µg / ml RNA. Der Quotient OD₂₆₀ zu OD₂₈₀ gibt Auskunft über eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen. Reine Nukleinsäuren liegen bei einem Quotienten zwischen 1,8 und 2,0 vor. DNA und RNA können allerdings nicht unterschieden werden. Daher wurde bei einer RNA-Isolation nach der cDNA-Synthese stets eine MECL-PCR (siehe Kapitel 2.3.7) durchgeführt, um sicherzugehen, dass die Probe nicht mit genomischer DNA verunreinigt war. Nach einer DNA-Isolation wurde verbliebene RNA durch eine RNase verdaut (siehe Tabelle 9).

2.3.3 DNA-Sequenzierung

Zur Überprüfung von Klonierungsprodukten wurden diese im Bereich der Insertion eines neuen Fragments sequenziert (*Sanger1975*). Alle Sequenzierungen erfolgten durch die Firma SeqLab, Göttingen, Deutschland. Die bereitgestellten Proben hatten ein Gesamtvolumen von 7 µl, enthielten jeweils 600 ng DNA und 20 pmol Primer. Die von der Sequenzierfirma ermittelte Basenabfolge wurde mittels des Programms „ApE“ (Biology Labs, Utah, USA) und ggf. Nukleotid-BLAST bei der NCBI-Datenbank überprüft und der korrekte Einbau des Inserts verifiziert.

2.3.4 DNA-Isolation

Für die Isolation von DNA aus eukaryotischen Zellen wurden 1×10^6 Zellen mittels Qiashredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert und das Zelllysate mit dem QIAamp DNA Mini and Blood Mini Kit (Qiagen) bearbeitet. Die Konzentration der so gewonnenen DNA wurde am Photometer bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2). Sofern die DNA nicht sofort weiterverwendet wurde, wurde sie bei -20°C gelagert.

2.3.5 RNA-Isolation

Für die Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen wurden 1×10^6 Zellen mittels Qiashredder-Säulen (Qiagen) homogenisiert und das Zelllysate mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben in RNase-freier Umgebung (Einsatz von RNase AWAY Lösung) bearbeitet. Die Funktionsweise des Kits basiert auf der „single-step“ Methode zur RNA-Isolation (*Chomczynski1987*). Die Konzentration der so gewonnenen RNA wurde am Photometer bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2). Die RNA wurde bei -80°C gelagert, sofern sie nicht sofort für die cDNA-Synthese weiterverwendet wurde.

2.3.6 cDNA-Synthese

Mit dem RevertAid cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher) wurden durch eine Reverse Transkriptase 500 ng RNA in cDNA umgeschrieben. Die Zusammensetzung des Ansatzes wurde nach Angaben des Herstellers gewählt und ist in Tabelle 29 aufgeführt.

Tabelle 29 Standard-Ansatz für Reverse Transkription

Substanz	Eingesetztes Volumen oder Konzentration
template-RNA	500 ng
5 x Reaktionspuffer	4 μ l
RNase-Inhibitor	1 μ l
dNTP-Mix (jeweils 10 mM)	2 μ l
Revert Aid Reverse Transkriptase	1 μ l
ddH ₂ O	ad. 20 μ l

Der Ansatz wurde für 1 h bei 42°C im PCR-Thermocycler (Eppendorf) inkubiert, anschließend die Reverse Transkriptase für 5 min bei 70°C inaktiviert und die umgeschriebene cDNA bei -20°C gelagert. Als Kontrollen wurden je ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase, ein Ansatz ohne template-RNA und eine im Kit enthaltene Positivkontrolle mit GAPDH-RNA mitgeführt. Zur Überprüfung der umgeschriebenen cDNA diente üblicherweise eine sogenannte MECL-PCR. Dafür wurde eine Standard-PCR (siehe Kapitel 2.3.7) mit spezifischen Primern durchgeführt. War noch genomische DNA in der Probe enthalten, wurde ein 700 bp Fragment amplifiziert. Lag, wie gewünscht, ausschließlich cDNA vor, war das Fragment 300 bp lang. Als Positivkontrolle für die Reverse Transkription wurden GAPDH-spezifische Primer für die Amplifizierung eines 475 bp großen Kontrollfragmentes in einem separaten Ansatz mitgeführt. Falls die PCR ergab, dass in der RNA-Präparation noch genomische DNA enthalten war, wurde ein DNase-Verdau nach Herstellerangaben (DNase I Kit, Qiagen) durchgeführt und aus der so gereinigten RNA erneut cDNA synthetisiert.

2.3.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“, PCR) (Mullis1986) ermöglicht die *in vitro* Vervielfältigung eines definierten DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotiden, die gegenläufig an die beiden komplementären DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung hierfür ist die Kenntnis der Sequenzen, die den zu amplifizierenden Bereich flankieren und die Verfügbarkeit geeigneter Oligonukleotid-Primer. Durch mehrmalige Wiederholung eines Zyklus, der sich im Allgemeinen aus den folgenden drei Teilschritten zusammensetzt, kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Fragmentes. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird durch eine Erhöhung der Temperatur auf 95°C der DNA-Doppelstrang in seine Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, erfolgt nach der Abkühlung auf eine bestimmte Temperatur die Anlagerung der Oligonukleotid-Primer an die jeweils

komplementären DNA-Einzelstränge in den flankierenden Bereichen des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes. Die Primer werden im nächsten Schritt von der DNA-Polymerase als Startermoleküle für die Polymerisationsreaktion benötigt. Während des dritten Schrittes, der Elongation, heftet eine thermostabile Polymerase Desoxyribonukleotid-Triphosphate (dNTPs) passend zur DNA-Matrize an die freien 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert somit den jeweils komplementären DNA-Strang. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der Matrizen-DNA-Moleküle. Außerdem können durch Oligonukleotide mit entsprechendem Überhang Restriktionsschnittstellen für spezifische Endonukleasen eingefügt werden.

In dieser Arbeit wurde das DreamTaq PCR-Set von Thermo Fisher verwendet. Die dNTPs ([c] je 100 mM) und 10 x Reaktionspuffer (enthält 20 mM Mg²⁺) wurden mitgeliefert und gemäß den Empfehlungen des Herstellers eingesetzt. Für die sequenzspezifische Hybridisierung der Primer an die Matrizen-DNA (Annealing) wurde eine vereinfachte Formel zur Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) verwendet:

$$T_m [^{\circ}C] = 2^{\circ}C \times (A + T) + 4^{\circ}C \times (G + C)$$

Formel 1 Berechnung der Primer-Schmelztemperatur

Die Amplifizierung des PCR-Produkts wurde überprüft, indem circa 10 µl des Ansatzes in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt wurden (siehe Kapitel 2.3.1.3). Der restliche PCR-Ansatz wurde, falls erforderlich, direkt für weitere Klonierungsschritte (wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben), weiterverwendet. Die Zusammensetzung einer Standard-PCR-Reaktion ist in Tabelle 30 und der Ablauf einer Standard-PCR-Reaktion in Tabelle 31 aufgeführt.

Tabelle 30 Standard-PCR-Ansatz

Substanz	Eingesetztes Volumen oder Konzentration
template-DNA	1 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl
dNTP-Mix (jeweils 100 mM)	0,25 µl
DreamTaq Polymerase	0,10 µl
Primer forward (100 pmol / µl)	0,50 µl
Primer revers (100 pmol / µl)	0,50 µl
ddH ₂ O	ad. 20 µl

Tabelle 31 Standard-PCR-Ablauf

	Programm-Abschnitt	Temperatur	Dauer
1	Initiation	94°C	4 min
2	Denaturierung	94°C	30 – 50 sek
3	Annealing	abhängig von Primer-T _m	30 – 50 sek
4	Elongation	72°C	30 – 90 sek (abhängig von Fragmentgröße, circa 1.000 bp pro Minute)
5	Wiederholung Schritt 2 - 4		35 x
6	Extension	72°C	10 min

2.3.8 ELISA

Mit Hilfe des Human CXCL12/SDF-1 DuoSet (R&D) und des Human INF γ ELISA Set (BD) wurde die Sekretion von Zytokinen in den Zellkulturüberstand von Zellen untersucht. Der ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“) bindet dabei Zytokine aus einem Medium durch spezifische Antikörper, die an den Boden einer 96-Wellplatte gebunden sind („capture antibodies“). Ein zweiter spezifischer, biotinkoppelter Antikörper („detection antibody“) wird hinzugegeben. Anschließend wird durch Gabe von Streptavidin-Meerrettichperoxidase ein Substrat in einen Farbstoff umgesetzt. Der Farbumschlag ist bei 450 nm im Photometer messbar.

Um die SDF-1 α -Ausschüttung zu überprüfen, wurden 25.000 am Vortag in 6-Well-Platten ausgesäte SDF-1 α -sekretierende Zellen für 24 h in 2 ml Hungermedium inkubiert, dann die Zellkulturüberstände (ZKÜ) abgenommen und 150 μ l ZKÜ für einen ELISA eingesetzt. Als Negativkontrollen wurden mit EGFP transduzierte Ausgangszellen sowie eine Mediumkontrolle eingesetzt. Für die SDF-1 α -Bestimmung wurde der jeweilige ZKÜ 1:10 verdünnt.

Für die Bestimmung der INF γ -Ausschüttung aktivierter NK-Zellen wurde eine Kokultivierung angesetzt (siehe Kapitel 2.5.8.3). Als Negativkontrollen wurden Wildtyp-Ausgangszellen sowie eine Mediumkontrolle eingesetzt. Hier betrug der Verdünnungsfaktor des ZKÜ 1:500. Die INF γ -Bestimmung wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Rebekka Wehner (TU Dresden, Institut für Immunologie) durchgeführt.

Je drei unabhängige Messungen im Duplett erfolgten im Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek). Die Mediumkontrolle (ohne Zytokine) wurde von den Messwerten subtrahiert und diese mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Außerdem wurde bei beiden ELISA-Assays ein Standard mit bekannter Konzentration von rekombinantem Zytokin mitgeführt und aus dessen Eichkurve die unbekannte Konzentration der Zytokine im Medium bestimmt.

2.4 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.4.1 Aufreinigung sekretierter Antikörper aus Zellkulturüberständen

Der scFv(MR1.1) („single chain fragment variable“, Einzelkettenantikörper) wurde im Rahmen dieser Arbeit in einem eukaryotischen Expressionssystem hergestellt und aufgereinigt. Hierfür wurden HEK 293T mit dem Vektor pSeqTag-MR1.1-BAP transfiziert (siehe Kapitel 2.5.2) und die Zellkulturüberstände nach fünf Tagen Kultivierung in 50 ml Greiner-Röhrchen gesammelt (Lagerung bei 4°C).

2.4.1.1 Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Säulchen

Zur Aufreinigung des Antikörpers aus dem Zellkulturüberstand wurden Ni-NTA-Säulchen (Qiagen) verwendet. Diese Säulen wurden zunächst mit 3 ml Imidazol (10 mM) äquilibriert und dreimal mit PBS gewaschen. 50 ml Zellkulturüberstand wurden zentrifugiert (14.000 rpm, 20 min, RT) um Zellschrott zu entfernen, dann auf die Ni-NTA-Säulchen aufgetragen und mittels Vakuumpumpe filtriert. Da der scFv(MR1.1) einen His-Tag trägt, bindet er zunächst an die Säule. Der Durchfluss wurde verworfen. Als nächstes wurden die Ni-NTA-Säulen mit Imidazol in verschiedenen Konzentrationen gewaschen. Der erste Waschschrift erfolgte mit 10 mM Imidazol (500 µl) bei 3.500 rpm für 3 min bei RT. Der zweite Waschschrift erfolgte mit 20 mM Imidazol (500 µl) ebenso bei 3.500 rpm für 3 min bei RT. Die Filtrate wurden jeweils in 2 ml Eppendorf-Tubes gesammelt. In den folgenden Schritten wurde Imidazol im Überschuss zugegeben. Es verdrängte die Bindung des His-Tags an die Säule und führte somit zur Elution des Einzelkettenantikörpers. Elution 1 und 2 erfolgten mit 500 µl von 350 mM Imidazol (3.500 rpm, 3 min, RT).

2.4.1.2 Dialyse

Um das Imidazol zu entfernen, musste das scFv(MR1.1)-Filtrat dialysiert werden. Eine spezielle Dialysemembran (SpectraPor Dialysis Membrane, Carl Roth) wurde mit dem Filtrat befüllt und über Nacht bei 4°C unter ständigem Rühren in 2 l PBS gelegt, wodurch es zu einem osmotischen Austausch des Imidazols durch PBS kam. Die Aufreinigung des Einzelkettenantikörpers wurde anschließend über eine Proteinbestimmung (siehe Kapitel 2.4.3) sowie SDS-Gelelektrophorese (Kapitel 2.4.4) und Immunoblot (Kapitel 2.4.5) überprüft.

2.4.2 Milde Lyse

Um aus eukaryotischen Zellen das Gesamt-Proteom für weiterführende Analysen zu gewinnen, wurden adhärenente Zellen abtrypsiniert (siehe Kapitel 2.5.1) bzw. Suspensionszellen samt Medium abgenommen. Die Zellen wurden pelletiert (1.200 rpm, 5 min, 4°C), einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert (1.200 rpm, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde gründlich entfernt, das Zellpellet in 100 – 500 µl eiskaltem RIPA-Lysepuffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Nach 30 min auf Eis

und mehrmaligem Vortexen wurden die Lysate mindestens für eine Nacht bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen auf Eis wurde das Lysat zentrifugiert (12.000 rpm, 5 min, 4°C) und der proteinhaltige Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt, um ihn von pelletiertem Zellschrott zu befreien. Die Konzentration der Proteinlösung wurde anschließend mittels BCA (siehe Kapitel 2.4.3) bestimmt oder das Lysat bis zur weiteren Verwendung erneut bei -80°C eingefroren.

2.4.3 Proteinbestimmung

Die BCA-Proteinbestimmung (*Smith1985*) nutzt die sogenannte Biuret-Reaktion. Proteine bilden mit Cu^{2+} Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex. Werden diese Kupferionen durch die Proteine zu Cu^{+} reduziert, bilden sie mit Bicinchonininsäure (BCA) einen violetten Komplex. Durch diese Komplexbildung wird das Absorptionsmaximum der Lösung verschoben, der Farbumschwung ist am Photometer bei einer Wellenlänge von 560 nm messbar.

Von den zu bestimmenden Proteinproben (siehe Kapitel 2.4.1) wurden mit RIPA-Lysepuffer eine 1:5 und eine 1:10 Verdünnung hergestellt. Die Verdünnungen wurden in Triplets von jeweils 10 μl in einer 96-Well-Platte aufgetragen und diese mit 200 μl BCA-Lösung (frisch hergestellt nach Herstellerangaben aus Lösung A und B im Verhältnis 50:1) versetzt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Farbumschwung am Synergy 2 Multi-Mode Microplate Reader (Biotek) gemessen. Mit Hilfe eines ebenfalls mitgeführten BSA-Standards wurde eine Eichkurve erstellt und der Proteingehalt der unbekanntenen Proben als Mittelwert bestimmt.

2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli (*Laemmli1970*) werden Proteine in einem Sammelgel (5 % Acrylamid) und einem Trenngel (8 – 12 % Acrylamid) aufgetrennt. Denaturierende Reaktionsbedingungen (β -Mercaptoethanol im Laemmli-Probenpuffer, Kochen bei 95°C) entfalten die Proteine und reduzieren Cysteinbrücken. Die Zugabe von SDS führt zur Maskierung der Eigenladung, so dass alle Proteine die gleiche negative Ladung besitzen und im elektrischen Feld ausschließlich aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Gele verwendet:

Tabelle 32 Zusammensetzung von Acrylamid-Gelen für die SDS-Gelelektrophorese

Komponenten	Sammelgel	Trenngel	Trenngel
	5 %	10 %	12 %
ddH ₂ O	2,8 ml	4,9 ml	4,4 ml
30 % Acrylamid	0,6 ml	2,5 ml	3,0 ml
Trenngelpuffer	-	2,5 ml	2,5 ml
Sammelgelpuffer	0,6 ml	-	-
20 % SDS	25 µl	50 µl	50 µl
10 % APS	50 µl	80 µl	80 µl
TEMED	5 µl	10 µl	10 µl

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol vollständig entfernt und das Sammelgel über dem Trenngel aufgetragen. Bis zum Auspolymerisieren des Sammelgels wurde ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Die so entstandenen Taschen wurden anschließend mit Laufpuffer gespült. Die Proteinproben wurden 1:1 mit 2 x Laemmli-puffer versetzt und für 10 min bei 95°C in einem Thermomixer aufgeköcht. Danach wurden je 50 µg der Proben in die Sammelgel-Taschen aufgetragen. Die Gele wurden in Elektrophoresekammern (Bio-Rad) eingesetzt und mit Laufpuffer überschichtet. Die Auftrennung der Proteinproben erfolgte im Sammelgel bei 80 V und im Trenngel bei 120 V. Die Stromstärke betrug nicht mehr als 20 mA. Um das Molekulargewicht der Proteinproben abschätzen zu können, wurde ein Proteingrößenstandard (Fermentas) mitgeführt.

2.4.5 Der „Semidry“-Western Blot von Proteinen auf PVDF-Membranen

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE wurden die negativ geladenen Proteine mit einem Semidry-Blotter (Bio-Rad) in einem elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran transferiert. In Vorbereitung des Blottens wurden Whatman-Filterpapiere mit Anodenpuffer I, Anodenpuffer II und Kathodenpuffer getränkt und die PVDF-Membran mit Methanol aktiviert. Die verschiedenen Filterpapiere, das SDS-Acrylamidgel sowie die PVDF-Membran wurden luftblasenfrei übereinandergeschichtet, der Blot erfolgte bei 25 V für 45 min bei RT.

2.4.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf PVDF-Membranen

Der Nachweis von Proteinen erfolgte durch spezifische Antikörper. Der primäre Antikörper ist gegen Epitope des Zielproteins gerichtet, während der an Meerrettichperoxidase („horse radish peroxidase“, HRP) gekoppelte sekundäre Antikörper spezieabhängig an den konstanten Bereich des ersten Antikörpers bindet. Die HRP setzt das Substrat Luminol in der Detektionslösung Luminata forte (Millipore) um. Die dabei freigesetzte Chemilumineszenz wurde im Bioimager LAS3000 (Fujifilm) bei verschiedenen Belichtungszeiten gemessen. Die Bildbearbeitung erfolgte anschließend mit Photoshop CS5 (Adobe) und die Quantifizierung der Lichtsignale mit dem Programm ImageJ (NIH, USA). Die einzelnen Arbeitsschritte nach dem „semidry“-Western Blot sind in Tabelle 33 aufgelistet.

Tabelle 33 Übersicht Arbeitsschritte beim immunologischen Nachweis von Proteinen

Arbeitsschritt	Inkubationsdauer	Temperatur
Inkubation mit Blockierlösung (II für Phosphoproteine, I für alle anderen)	1 h	RT
Inkubation mit primärem Antikörper	1 h oder ü. N.	RT 4°C
Waschen der Membran mit 1 x TBS-TT	3 x 10 min	RT
Waschen der Membran mit 1 x TBS	1 x 10 min	RT
Inkubation mit sekundärem Antikörper	1 h	RT
Waschen der Membran mit 1 x TBS-TT	3 x 10 min	RT
Waschen der Membran mit 1 x TBS	1 x 10 min	RT
Inkubation der Membran mit Detektionslösung	1 min	RT
Detektion der Chemilumineszenz	30 sek – 15 min	RT

Sollte die Membran für einen weiteren immunologischen Nachweis genutzt werden, wurden anschließend die gebundenen Antikörper durch das sogenannte „Stripping“ (siehe 2.4.7) abgelöst.

2.4.7 „Stripping“ von PVDF-Membranen

Diese Methode („to strip“, ablösen) ermöglicht nach vollständigem Ablösen der an ihre Epitope gebundenen Antikörper eine erneute Detektion von Proteinen mit anderen Antikörpern. Die Membran wurde hierfür nach der Detektion kurz mit TBS gewaschen und für 60 min bei 55°C im Wasserbad in Strippingpuffer mit β -Mercaptoethanol inkubiert. Danach wurde die Membran erneut mit TBS gewaschen und für 1 h mit 5 % BSA (Blockierlösung II) oder 5 % Milch (Blockierlösung I) blockiert. Das weitere Vorgehen entsprach der Beschreibung in Kapitel 2.4.6. Da sowohl die Waschschrte mit dem Tween20-haltigen Waschpuffer als auch die Behandlung mit β -Mercaptoethanol dazu führen, dass sich ein Teil der Proteine von der PVDF-Membran löst oder dass Phosphogruppen durch die Inkubation mit milchpulverhaltiger Blockierlösung dephosphoryliert werden, wurden Membranen generell nicht häufiger als zweimal mit verschiedenen Antikörpern inkubiert.

2.5 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN

2.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar-Air-Flow HERAsafe (Heraeus) Sterilbank durchgeführt und Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂-Atmosphäre und 80 % Luftfeuchte gelagert. Einen Überblick über die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen gibt Tabelle 25. Adhärente Zelllinien wurden in liegenden Zellkulturflaschen kultiviert, Suspensionszellen in stehenden Zellkulturflaschen. Ein Mediumwechsel erfolgte spätestens aller drei Tage. Adhärente Zellen wurden vereinzelt, wenn der Boden der Zellkulturflasche zu 80 - 100 % von einem konfluenten Zellrasen bewachsen war. Hierfür wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, der Zellrasen vorsichtig

mit PBS gespült und danach für 5 min mit 2 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung benetzt. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 8 ml FKS-haltigem Medium abgestoppt und die Zellen mit 1.200 rpm für 5 min bei RT pelletiert. Suspensionszellen wurden aller drei Tage pelletiert (1.200 rpm, 5 min, RT). Die pelletierten Zellen wurden in 1 ml frischem Medium resuspendiert, in der Zellkulturflasche frisches Medium vorgelegt und – je nach Zelllinie oder Bedarf – 1/5 bis 1/100 der Zellsuspension oder aber eine definierte Zellzahl für weiterführende Experimente eingesät.

2.5.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde in eine Neubauer-Zählkammer aus einer 1:10 Verdünnung von Zellsuspension mit Trypanblau (0,4 %, v / v) bestimmt. Die Berechnung der Lebendzellzahl erfolgte nach unten stehender Formel. Die gewünschte Zahl an vitalen Zellen wurde dann mit adäquatem Medium eingestellt.

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Zahl lebender Zellen in 64 Feldern}}{4} \times \text{Verdünnungsfaktor } 10 \times 10.000$$

Formel 2 Berechnung Lebendzellzahl

2.5.1.2 Isolation von primären humanen NK-Zellen aus peripherem Blut

Alle Arbeiten mit Blut wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Spender im Rahmen des Ethik-Votums der Ethik-Kommission: "Phänotypische und funktionelle Untersuchungen von peripheren mononukleären Zellen (Natürliche Killerzellen, T-Zellen) im Rahmen der Immunabwehr von Tumoren" (Aktenzeichen: EK242102007) durchgeführt.

Circa 50 ml venöses Blut wurde in handelsüblichen EDTA-Röhrchen abgenommen und primäre NK-Zellen über eine Dichtegradienten-Zentrifugation in einem Ficoll-Gradienten isoliert. Das periphere EDTA-Blut wurde 1:1 mit PBS vermischt, 20 ml Ficoll-Lösung in 50 ml Greiner-Röhrchen vorgelegt und diese vorsichtig mit 30 ml des verdünnten Bluts überschichtet. In einem Zentrifugationsschritt (1.500 rpm, 25 min, RT, ohne Bremse) wurde das Blut aufgrund der unterschiedlichen Dichte seiner Bestandteile aufgetrennt. Die schweren Erythrozyten sammelten sich am Boden, darüber befanden sich die Ficoll-Lösung und das Serum. Die peripheren mononukleären Blutzellen („peripheral blood mononuclear cells“, PBMC) lagen in der Interphase zwischen Ficoll und Serum. Sie wurden mit Hilfe einer Serumpipette abgenommen und in ein neues 50 ml Greiner-Röhrchen überführt. Die isolierten PBMC wurden dreimal mit 10 ml eiskaltem PBS gewaschen und zentrifugiert (1.200 rpm, 10 min, 4°C), anschließend in 2 ml PBS resuspendiert und mit Hilfe einer Neubauer-Kammer gezählt (siehe Kapitel 2.5.1.1). Zweimal 200.000 Zellen wurden für eine fluoreszenzanalytische Messung am Ende der Isolation abgenommen und auf Eis verwahrt. Die restliche PBMC-Suspension wurde erneut zentrifugiert (1.200 rpm, 10 min, 4°C), der Überstand verworfen. Pro 10⁷ Zellen wurden 40 µl PBS, 10 µl NK Cell Biotin Antibody Cocktail und 20 µl NK Cell anti-Biotin-Microbead Cocktail (beides NK Cell Isolation Kit,

Miltenyi) eingesetzt. Der biotinkoppelte Antikörper-Cocktail besteht laut Herstellerangaben aus Antikörpern gegen Antigene, die nicht auf NK-Zellen exprimiert werden. Die magnetischen Microbeads sind mit anti-Biotin-Antikörpern beladen. Nicht-NK-Zellen wurden so mit den Beads markiert und im magnetischen Feld eines MACS Separators (Miltenyi) in einer MACS-Säule (LS Column, Miltenyi) zurückgehalten, während NK-Zellen die Säule ungehindert passierten und sich im Durchfluss anreicherten. Die NK-Zellen des Durchflusses wurden in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und wieder zweimal 200.000 Zellen für die anschließende fluoreszenzanalytische Messung abgenommen. Die restlichen NK-Zellen wurden in 24-Well-Platten mit supplementiertem CellGro-Medium (CellGro (komplett), siehe Tabelle 18) in Kultur genommen (siehe Kapitel 2.5.1), und zudem mit dem NK Cell Activation / Expansion Kit (Miltenyi) inkubiert. Dieses Kit besteht aus anti-Biotin MACSiBead Partikeln und biotinylierten Antikörpern gegen NKp46 und CD2. Durch Kultivierung der frisch isolierten, ruhenden, primären NK-Zellen mit diesen Antikörpern in einem 2:1-Verhältnis wurden die Zellen sowohl aktiviert als auch zur Proliferation angeregt.

2.5.1.3 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zelllinien

Für die langfristige Aufbewahrung von Zelllinien wurden diese kryokonserviert. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen pelletiert (1.200 rpm, 5 min, RT), einmal mit PBS gewaschen und in Kryoröhrchen mit Einfriermedium (siehe Tabelle 18) gründlich resuspendiert. In einem Kryokonservierungsgefäß mit Isopropanol wurden die Zellen bei -80°C sehr langsam (circa 1 K / min) eingefroren, damit sich keine Eiskristalle bildeten. Anschließend wurden die Kryokonserven bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Ansetzen einer Kultur aus eingefrorenen Zellen wurden die Kryoröhrchen unter fließend warmem Wasser aufgetaut und der Inhalt sofort in ein Greiner-Röhrchen mit 5 ml Medium überführt. Nach Abzentrifugation (1.200 rpm, 5 min, RT) wurde der Überstand abgesaugt und somit das zytotoxische DMSO entfernt. Das Zellpellet wurde in frischem Medium resuspendiert, in eine Kulturflasche überführt und diese im Brutschrank gelagert. Nach spätestens 24 h wurde ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt.

2.5.2 Transiente Transfektion mit Polyethylenimin

Als Transfektion bezeichnet man das Einschleusen von Fremd-DNA in eine Wirtszelle. In dieser Arbeit wurden HEK 293T mit dem kationischen Polymer Polyethylenimin (PEI) transfiziert, der nukleinsäurebindende und -kondensierende Eigenschaften besitzt. Wird negativ geladene DNA mit PEI vermischt, bilden sich DNA-Polykation-Komplexe, die von den HEK 293T via Endozytose aufgenommen werden. Durch den sogenannten Protonsponge-Effekt des Polykations wird einer Degradierung von DNA entgegengewirkt, so dass ein effizienter Transfer stattfindet (Boussif1995). Die PEI-Transfektion wurde genutzt, um sekretierten Einzelkettenantikörper oder virushaltige Zellkulturüberstände zu produzieren. Die Arbeitsschritte sind in Tabelle 34 aufgelistet. Die Gabe von Natriumbutyrate verstärkt die

Aktivität des in den Verpackungsplasmiden (siehe Tabelle 21) kodierten Zytomegalovirus-Promoters (CMV) und führt so zu einer verbesserten Expression der eingebrachten Fremd-DNA (Soneoka1995).

Tabelle 34 Ablauf der Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyethylenimin

Tag 1	Substanz	10 cm Schale
HEK 293T-Zellen aussäen	Zellen pro Schale Medium pro Schale	4 x 10 ⁶ 6 ml
Tag 2	Substanz	5 ml Greiner-Röhrchen
PEI-Lösung ansetzen	PEI (1 mg / ml) DMEM (ohne)	45 µl 955 µl
DNA-Lösung ansetzen	Gesamt-DNA DMEM (ohne)	15 µg ad. 1.000 µl
PEI und DNA mischen	PEI-Lösung	1.000 µl
	DNA-Lösung	1.000 µl
	vorsichtig aber gründlich mischen, 15 – 30 min Inkubation bei RT	
Mediumwechsel bei HEK 293T in 10 cm Schalen mit 4 ml DMEM (15 %), 2 ml PEI-DNA-Mix zugeben Zellen über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren		
Tag 3	Substanz	10 cm Schale
Natriumbutyrat-Induktion	Natriumbutyrat (500 mM / ml)	120 µl (10 mM / ml)
Mediumwechsel nach 6 - 8h	DMEM (komplett)	5 ml
Zellen über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubieren		

2.5.3 Generierung von lentiviralen Zellkulturüberständen

Zur Generierung lentiviraler Zellkulturüberstände (ZKÜ) wurde das Drei-Plasmid-System nach Soneoka (Soneoka1995) eingesetzt, da es eine sichere Methode darstellt, nach transienter Transfektion rekombinante replikationsinkompetente Vektoren für einen viralen Gentransfer zu generieren. Das modifizierte virale Genom integriert stabil in das Zielzell-Genom, wodurch eine beständige und langfristige Expression des eingebrachten Transgens auch in ruhenden Zielzellen ermöglicht wird. Das in dieser Arbeit verwendete lentivirale System beruhte auf dem Humanen Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1). Der eukaryotische Expressionsvektor pCD/NL-BH liefert die Information für das gruppenspezifische Antigen (Gag) und das virale Proenzym (Pol), der Vektor pcz-VSV-G kodiert für das Hüllprotein (Env). Der dritte eingebrachte Vektor trägt das modifizierte virale Genom, welches unter anderem für das gewünschte Transgen kodiert.

In dieser Arbeit wurden HEK 293T als Verpackungszellen zur Gewinnung replikationsinkompetenter lentiviraler Partikel genutzt. Nach der transienten Transfektion von HEK 293T (siehe Kapitel 2.5.2) mit jeweils 5 µg der drei Plasmide produzierten diese Zellen virale Vektorpartikel und setzten sie ins Medium frei. Der ZKÜ wurde am vierten Tag abgenommen, mit einem 0,45 µm Filter steriltfiltriert und frisch für die Transduktion von Zielzellen eingesetzt.

2.5.4 Stabile Transduktion

2.5.4.1 Transduktion von Zelllinien

Wenn fremde DNA mittels eines Virus in die Zielzellen übertragen wird, spricht man von Transduktion. Hierfür wurden 12 h vor Transduktion 1×10^6 Zielzellen in kleinen Zellkulturflaschen oder in 6-Well-Platten eingesät und am nächsten Tag mit dem von HEK 293T produzierten Virusüberstand inkubiert. Dem ZKÜ wurde 8 µg / ml Polybren hinzugefügt. Eine zweite Transduktion erfolgte nach 8 - 24 h, eine dritte nach 48 h.

Um möglichst eine Reinpopulation von transduzierten Zellen zu generieren, folgte ein Selektionsschritt mit dem Antibiotikum, dessen Resistenzgen auf der eingebrachten Fremd-DNA kodiert war. Verwendete Antibiotika und Konzentrationen sind in Tabelle 3 aufgelistet.

2.5.4.2 Transduktion von primären humanen NK-Zellen

Für die Transduktion von primären humanen NK-Zellen wurde auf eine hohe MOI („multiplicity of infection“) von mindestens 30 geachtet, da nur hohe Virustiter zu ausreichenden Transduktionseffizienzen führen (siehe Kapitel 2.5.4.3). Da mit der in Kapitel 2.5.4.1 beschriebenen Weise keine ausreichende Expression vor allem der großen chimären Rezeptorkonstrukte (siehe Tabelle 22) erreicht werden konnte, wurde ein abgewandeltes Protokoll nach Sutlu et al. (Sutlu2012) angewandt. Primäre humane NK-Zellen wurden ab Tag 2 nach Isolation mit Virusüberstand inkubiert. Zusätzlich zu 8 µg / ml Polybren wurden 1000 IU / ml IL-2, 20 ng / ml IL-21 und 2,5 µM BX795 beigefügt. Mit Gabe der Zytokine wurde gewährleistet, dass die primären Zellen auch während der Transduktion proliferieren und ausreifen. Zudem wurde eine Spin-Transduktion durchgeführt, d. h. die im Virusüberstand resuspendierten NK-Zellen wurden für 1 h mit 1.800 rpm bei 37°C zentrifugiert, ehe sie für 6 - 8 h bei 37°C im Brutschrank weiterkultiviert wurden. Danach wurde der Virusüberstand abgenommen und die NK-Zellen in CellGro-Medium (komplett) resuspendiert. Die Transduktion primärer NK-Zellen wurden zweimal wiederholt. Danach wurden die Zellen für 4 bis 6 Tage weiterkultiviert, ehe sie für 6 h mit dem jeweiligen Antibiotikum (siehe Tabelle 3) selektioniert und Transduktionseffizienzen mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.5.5) überprüft wurden.

2.5.4.3 Virustiterbestimmung und Berechnung der „multiplicity of infection“

Um den Titer der generierten Viren zu bestimmen, wurden Plasmide mit einem EGFP-Markergen verwendet. Für virale Partikel mit Puromycin-Resistenz tragender Fremd-DNA wurde vorausgesetzt, dass sie aufgrund der gleichen Plasmidgröße über eine ähnliche Transduktionseffizienz verfügen.

Am Vortag der Virustiterbestimmung wurden 100.000 HT1080-Zellen in 24-Well-Platten eingesät. Am nächsten Tag wurde der ZKÜ entfernt und durch 1 ml virushaltigen ZKÜ ersetzt. Dieser wurde entweder unverdünnt oder verdünnt mit Medium 1:10, 1:100, 1:1.000 und 1:10.000 eingesetzt. Nach 6 - 8 h erfolgte ein Mediumwechsel. Am Tag nach der Transduktion wurde mittels durchflusszytometrischer Analyse (siehe Kapitel 2.5.5) der Prozentsatz grün fluoreszierender Zellen im FL-1-Kanal bestimmt und der Titer des eingesetzten viralen Überstands berechnet.

$$\text{Titer} = 2 \ln \left(1 - \left[\frac{\% \text{ EGFP} - \text{mock}}{100} \right] \right) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Zellzahl}$$

Formel 3 Berechnung Virustiter

Für den „mock“ wurden Zellen eingesetzt, die nicht fluoreszieren. In die Berechnung flossen weder Werte ein, die kleiner als der dreifache Negativwert waren, noch solche mit einem Prozentsatz von EGFP-positiven Zellen größer 80. Anhand des Titers, der für die Transduktion eingesetzten Zellzahl (in dieser Arbeit stets 100.000 Zellen) und der gewünschten MOI („multiplicity of infection“) von mindestens 30 wurde das benötigte Volumen des virushaltigen ZKÜ für die Transduktion bestimmt.

$$V (\text{virushaltiger ZKÜ}) = \frac{\text{MOI} \times \text{Zellzahl}}{\text{Titer}}$$

Formel 4 Berechnung benötigtes Volumen an virushaltigem ZKÜ für eine bestimmte MOI

2.5.5 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können Zellen im FACS-Gerät („fluorescence activated cell sorter“, MACS Quant, Miltenyi) auf Größe und Granularität bzw. auf das Vorhandensein bestimmter Antigene untersucht werden. Im FACS-Gerät werden einzelne Zellen aus einer Zellsuspension in einem kontinuierlichen, laminaren Hüllstrom fokussiert und passieren einzeln einen monochromatischen Argonlaser (488 nm). Empfindliche Photomultiplikatoren detektieren sowohl das im rechten Winkel abgestrahlte Seitwärtsstreulicht (SSC), welches ein Maß für die intrazelluläre Granularität ist, als auch das Vorwärtsstreulicht (FSC), welches mit der Größe der Zelle korreliert. So können Zellfragmente erkannt und aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Außerdem kann die emittierte Fluoreszenz in drei Kanälen bei unterschiedlichen Wellenlängen (FL-1: 530 nm; FL-2: 597

nm; FL-3: 650 nm) gemessen werden. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern können definierte Antigene auf der Oberfläche von Zellen oder intrazytoplasmatisch detektiert und eine Phänotypisierung durchgeführt werden. Die spezifischen Antikörper sind entweder direkt mit fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert, oder die Detektion erfolgt mit einem primären spezifischen Antikörper und einem zweiten fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper, der artspezifisch gegen die Immunglobulinklasse und Herkunftsspezies des ersten Antikörpers gerichtet ist. Eine Übersicht über die verwendeten Antikörper geben Tabelle 4 und 5. Die Auswertung der Daten erfolgte über die Software FloJo (Tree Star, Ashland, USA).

2.5.5.1 Oberflächenfärbung mit Antikörpern

Zellfärbungen wurden auf Eis in einer 96-Well-Spitzbodenplatte durchgeführt. Dafür wurden jeweils 100.000 Zellen pelletiert (1.200 rpm, 5min, 4°C), mit PBS gewaschen, mit primärem Antikörper (verdünnt in Blockierlösung PBS + 1 % BSA) versetzt und je nach Herstellerangaben für 15 – 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zentrifugation pelletiert (1.200 rpm, 5min, 4°C). Bei nicht markierten Primärantikörpern wurde in einem zweiten Färbungsschritt der in Blockierlösung verdünnte sekundäre Antikörper zu den Zellen hinzugefügt und eine weitere Stunde bei 4°C inkubiert. Für die Fluoreszenzmessung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 100 µl PBS + 1 % BSA resuspendiert.

2.5.5.2 Intrazelluläre Antikörperfärbungen

Exprimierten Zellen das zu untersuchende Antigen nicht auf ihrer Oberfläche sondern intrazellulär, wurde die Zellmembran zunächst permeabilisiert. Hierfür wurden 100.000 Zellen abzentrifugiert (1.200 rpm, 5min, 4°C) und in 4%iger PFA-Lösung für mindestens 24 h fixiert. Dann wurden die Zellen mit 500 µl PBS gewaschen (1.200 rpm, 5min, 4°C), der Überstand abgenommen und die Zellen in PBS + 1 % BSA + 0,3 % Triton X-100 Permeabilisierungslösung aufgenommen. Nach einer Inkubation von 10 min bei RT erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt (1.200 rpm, 5min, 4°C). Die Färbung mit dem primären und ggf. sekundären Antikörper erfolgte wie beschrieben (Kapitel 2.5.5.1), doch wurden die Antikörper nicht in Blockierungslösung, sondern in Permeabilisierungslösung verdünnt.

2.5.6 Bestimmung des klonalen Überlebens von Langzeitzellkulturen

Um den Effekt einer Transduktion bzw. Kotransduktion auf das klonale Überleben von Glioblastomzellen zu analysieren, wurden je 1.000 Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen ausplattiert. Die Zellen wurden für 14 Tage erschütterungsfrei im Brutschrank kultiviert und nach dieser Zeit zur besseren Visualisierung mit Giemsa-Lösung gefärbt. Hierfür wurden die entstandenen Zellhaufen (Klone) nach einmaligem Waschen mit PBS mit 70 % Ethanol fixiert (5 min, RT) und für eine Minute mit Giemsa-Lösung (Merck, Darmstadt)

inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in Leitungswasser von überschüssiger Färbelösung befreit und die Anzahl der gewachsenen Klone bestimmt. Der Versuch wurde dreifach ausgeführt und die Signifikanz der Unterschiede mittels Student's t-Test berechnet.

2.5.7 Überprüfung des Migrationsverhaltens *in vitro*: Der Boyden-Kammer-Assay

Die gerichtete Migration entlang der SDF-1 α / CXCR4-Achse wurde *in vitro* mit einem Boyden-Kammer-Assay untersucht (Boyden1962). Zwei Kammern werden durch einen Filter mit definierter Porengröße voneinander getrennt. Ein chemotaktischer Stufengradient wird erzeugt, indem in der unteren Kammer der zu untersuchende Chemoattraktor vorgelegt wird und in der oberen Kammer chemokinfreies Medium. Zellen aus der oberen Kammer migrieren durch die Poren des Filters hindurch in die untere Kammer, wenn sie auf das Chemokin ansprechen. Da YTS und primäre humane NK-Zellen als Suspension und nicht adhärent wachsen, bleiben sie nach Migration nicht auf der Filterunterseite haften, sondern sammeln sich darunter in dem chemokinhaltigen Medium. Die Migrationseffizienz wird durch Zellzählung im unteren Well mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Als Chemokinquelle wurden SDF-1 α sekretierende Zellen bzw. EGFP-exprimierende Zellen als Negativkontrolle genutzt. Je 25.000 Zellen wurden am Vortag des Versuchs in eine 24-Well-Platte eingesät. Am darauffolgenden Tag wurde ein Mediumwechsel mit FKS-freiem Medium durchgeführt. Nach 4 h wurde der ZKÜ der Zellen abgenommen und davon 1 ml in die unteren Wells einer Boyden-Kammer überführt. Für die experimentelle Untersuchung ihres potentiellen Migrationsverhaltens wurden in den oberen Wells der Kammer jeweils 50.000 CXCR4-positive YTS oder NK-Zellen bzw. als Negativkontrolle Wildtypzellen in einem Volumen von 100 μ l FKS-freiem Medium eingesetzt, die zuvor 48 h lang in FKS-freiem Medium gehungert worden waren. Da YTS größer als primäre NK-Zellen sind, wurden für diese Zellen Boyden-Kammern mit 8 μ m Porengröße genutzt, während für primäre NK-Zellen Boyden-Kammern mit 3 μ m Porengröße verwendet wurden. Um zu zeigen, dass die Migration tatsächlich abhängig vom Chemokin SDF-1 α war, wurde zusätzlich als Kontrolle ein Inhibitor des CXCR4-Chemokinrezeptors (AMD3100) in einer Konzentration von 25 μ g / ml mitgeführt. Die Kammern wurden für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert, dann wurden die Zellen im unteren Well ausgezählt. Es wurde pro Kombination stets eine Doppelkontrolle durchgeführt, der Versuch dreimal wiederholt und die Signifikanz der Unterschiede mittels Student's t-Test berechnet. Ein typischer Versuchsaufbau ist in Tabelle 35 gezeigt.

Tabelle 35 Versuchsaufbau Migration im Boyden-Kammer-Assay

wt	50.000 Zellen oberes Well	ZKÜ EGFP	ZKÜ SDF-1 α	ZKÜ EGFP + AMD3100
	50.000 Zellen unteres Well	ZKÜ EGFP	ZKÜ SDF-1 α	ZKÜ SDF-1 α + AMD3100
CXCR4	50.000 Zellen oberes Well	ZKÜ EGFP	ZKÜ SDF-1 α	ZKÜ EGFP + AMD3100
	50.000 Zellen unteres Well	ZKÜ EGFP	ZKÜ SDF-1 α	ZKÜ SDF-1 α + AMD3100

2.5.8 Überprüfung des zytotoxischen Potentials *in vitro*

Mit den folgenden Versuchen wurde untersucht, ob die Armierung von NK-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren zu deren Aktivierung und zu einer spezifischen Lyse von antigenträgenden Zielzellen führt.

2.5.8.1 ZAP70-Phosphorylierung

Bindet der chimäre Antigenrezeptor an sein Antigen, werden ausgehend von den ITAM der Signaluntereinheit verschiedene zytosolische Proteine phosphoryliert und somit eine aktivierende Signalkaskade induziert. Am Beginn dieser Signalkaskade steht die Phosphorylierung von ZAP70, die mittels proteinbiochemischer Methoden (siehe Kapitel 2.4) nachgewiesen werden kann.

Für die Untersuchung der ZAP70-Phosphorylierung wurden am Vortag des Experiments 8×10^5 HEK 293T Wildtypzellen und HEK 293T^{EGFR^{vIII}} in 6-Wellplatten eingesät. Je 4×10^6 YTS, die mit dem chimären Antigenrezeptor bzw. mit Kontrollkonstrukten armiert wurden, wurden zudem für 48 h in FKS-freiem Medium gehungert. Für das Experiment wurde das Medium in den 6-Wellplatten abgenommen, die HEK 293T vorsichtig mit PBS gespült und anschließend für 4 h bei 37°C mit je 4×10^6 YTS in 5 ml Hungermedium kokultiviert. Anschließend wurden das Medium samt YTS-Zellen abgenommen, zentrifugiert (5 min, 1.200 rpm, RT) und das Zellpellet in 100 μ l RIPA-Lysepuffer (mit Aprotinin 1:1000, Leupeptin 1:500 und Phosphataseinhibitor-Cocktail 1:100) in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt. Für mindestens 30 min wurden die Lysate auf Eis inkubiert, alle 10 min gründlich gevortext und dann bei -80°C bis zur weiteren Verwendung weggefroren. Da ZAP70 ausschließlich von NK-Zellen exprimiert wird, war eine bei der Ernte nicht auszuschließende Verunreinigung der Lysate mit HEK 293T nicht von Bedeutung. Die Zelllysate wurden im weiteren Verlauf wie in Kapitel 2.4 beschrieben behandelt und ein immunologischer Nachweis gegen phosphoZAP70 und ZAP70 sowie α -Tubulin als Ladekontrolle geführt.

2.5.8.2 Degranulation

Zum Nachweis der Degranulation bei primären humanen NK-Zellen wurden eine Kokultivierung und ein durchflusszytometrisches Experiment durchgeführt. Als Zielzellen dienten U87-MG Wildtypzellen und U87-MG^{EGFRvIII}. Effektorzellen waren expandierte und aktivierte NK-Zellen, die mit dem chimären Antigenrezeptor bzw. einem Kontrollkonstrukt transduziert und selektioniert worden waren. Die NK-Zellen wurden für 48 h in FKS-freiem CellGro (ohne) gehungert. Am dritten Tag wurden die U87-MG Wildtypzellen und U87-MG^{EGFRvIII} geerntet, gewaschen und nach Zellzählung auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen in 100 μ l CellGro (ohne) eingestellt. Auch die NK-Zellen wurden gezählt und auf 1×10^5 Zellen in 100 μ l CellGro (ohne) eingestellt. In einer 48-Well-Platte wurden Ziel- und Effektorzellen für 6 h mit einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:1 bei 37°C im Brutschrank kokultiviert, außerdem wurden als Kontrolle NK-Zellen allein in Medium ohne Zielzellen kultiviert. Eine Stunde nach Beginn der Kokultivierung wurde 2 mM Monensin zu jedem Well hinzugegeben. 30 Minuten vor Ende der Kokultivierung wurden die Zellen direkt im Well mit anti-CD107a-PE (Miltenyi, 1:15) und der entsprechenden Isotypkontrolle (Miltenyi, 1:15) gefärbt, dann gewaschen (1.200 rpm, 5 min, 4°C) und durchflusszytometrisch analysiert. Im Forward-Sideward-Scatter wurde ein Auswahlfeld auf die NK-Zellen gelegt und die rote Fluoreszenz der gebundenen Antikörper gemessen (siehe Kapitel 2.5.5). Der Versuch wurde mit NK-Zellen von zwei verschiedenen Spendern zweimal wiederholt und das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensitäten (MFI) bestimmt. Die MFI der Mediumkontrolle (basale Degranulation) wurde auf 1 gesetzt und die MFI der Kokultivierung mit Wildtyp-Zielzellen und EGFRvIII-exprimierenden Zielzellen dazu in Relation gesetzt.

2.5.8.3 INF γ -Sekretion

Um die Freisetzung von zytotoxischen Zytokinen nach Antigenerkennung durch die armierten NK-Zellen zu untersuchen, wurde deren INF γ -Sekretion überprüft. Auch diesem Experiment liegt eine Kokultivierung von U87-MG-Zielzellen mit NK-Effektorzellen zugrunde. CAR-tragende NK-Zellen bzw. Kontrollen wurden für 48 h in CellGro (ohne) gehungert und anschließend auf eine Konzentration von 1×10^5 Zellen in 100 μ l Medium eingestellt. U87-MG Wildtypzellen und U87-MG^{EGFRvIII} wurden abtrysiniert, mit PBS gewaschen und auf eine Konzentration von 5×10^5 Zellen pro 100 μ l Medium eingestellt. Ziel- und Effektorzellen wurden in einer 96-Well-Platte gemischt und mit einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:5 für 6 h kokultiviert. NK-Zellen ohne Zielzellen dienten als Kontrolle. Dann wurden die Zellen zentrifugiert (1.200 rpm, 5 min, RT) und die Zellkulturüberstände abgenommen. Bis zur Untersuchung des INF γ -Gehalts mittels ELISA (siehe Kapitel 2.3.8) verblieben die Zellkulturüberstände bei -20°C.

2.5.8.4 Chromfreisetzung-Assay

Für die experimentelle Untersuchung der zellulären Zytotoxizität der mit einem chimären Antigenrezeptor armierten Effektorzellen (YTS bzw. primäre humane NK-Zellen) wurde ein Chromfreisetzung-Assay durchgeführt. Verschiedene Zielzellen wurden mit radioaktivem ^{51}Cr beladen und anschließend mit den Effektorzellen kokultiviert. Aus lebenden, intakten Zielzellen diffundiert das Chrom nur sehr langsam in den Überstand, während es aus apoptotischen oder bereits abgetöteten Zellen schnell freigesetzt wird. Die Menge an freigesetzter Radioaktivität im Überstand der Kokultur stellt daher ein Maß für die zytotoxische Aktivität der Effektorzellen dar.

Die mit Kompletmedium auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen / ml eingestellten Zielzellen wurden mit $\sim 1,5 \text{ MBq } ^{51}\text{Cr}$ versetzt und für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Zellen zur Entfernung von überschüssigem extrazellulärem ^{51}Cr dreimal gründlich mit PBS gewaschen (360 g, 3 min, RT) und in 1 ml Medium ohne FKS aufgenommen. Dann wurde die Konzentration der Zielzellen auf 1×10^6 Zellen / ml und die Konzentration der Effektorzellen auf 2×10^6 Zellen / ml eingestellt. Von den so verdünnten Zellsuspensionen wurden in einer 96-Well-Rundbodenplatte Effektorzellen und Zielzellen in einem Effektor-Target-Verhältnis von 20:1, 10:1, 5:1 bei NK-Zellen oder 10:1, 5:1, 2,5:1 bei YTS-Zellen jeweils in Triplets ausgesät, mit FKS-freiem Medium auf ein Gesamtvolumen von $200 \mu\text{l}$ aufgefüllt und bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Zur Berechnung der spezifischen Lyse wurden zusätzlich zwei Kontrollen mitgeführt. Zum einen wurde die spontane Freisetzung von Chrom aus intakten Zielzellen bestimmt (minimale Freisetzung), zum anderen die maximale Chromfreisetzung durch Lyse der Zellen in einer 5 % Triton X-100-Lösung. Der Zytotoxizitätstest wurde für primäre NK-Zellen in einem Zeitraum von 4 – 8 h und für YTS-Zellen im Zeitraum von 21 h durchgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen abzentrifugiert und je $25 \mu\text{l}$ der Überstände vorsichtig in eine flexible 96-Well-Szintillationsplatte überführt, in deren Wells jeweils $150 \mu\text{l}$ einer Szintillationsflüssigkeit vorgelegt worden waren. Die Menge an freigesetztem ^{51}Cr in cpm („counts per minute“) konnte mit Hilfe eines Flüssig-Szintillationsmessers (Wallac MicroBeta TriLux) bestimmt werden. Die Berechnung der spezifischen Lyse erfolgte nach der Formel:

$$\begin{aligned} \text{spezifische Lyse [\%]} \\ = 100 \times \frac{\text{cpm experimentelle Freisetzung} - \text{cpm minimale Freisetzung}}{\text{cpm maximale Freisetzung} - \text{cpm minimale Freisetzung}} \end{aligned}$$

Formel 5 Berechnung spezifische Lyse im Chromfreisetzung-Assay

2.5.9 HLA-Typisierung von eukaryotischen Zellen

Die HLA-Typisierung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen (Zelllinien und primäre humane NK-Zellen) führte Dr. Monika Füssel (DKMS Dresden) mittels PCR (siehe Kapitel 2.3.7) mit sequenzspezifischen Primern (PCR-SSP) durch. Die HLA-Typisierung sollte helfen, durch einen geeigneten „match“ von Zielzellen und NK-Zellen eine Aktivierung von NK-Zellen aufgrund der von ihnen als „fremd“ erkannten Oberflächenmerkmale der Zielzellen zu minimieren (Graft-versus-Host-Reaktion), um tatsächlich nur den Effekt des chimären Antigenrezeptors auf die Aktivierung der NK-Zellen untersuchen zu können.

2.6 *IN VIVO* TIERVERSUCHE

Tierversuche wurden entsprechend der geltenden rechtlichen Bestimmungen mit NMRI_{NuNu}-Mäusen (*Flanagan1966*) durchgeführt (Tierversuchsantrag 24-9168.11-1/2012-24). Diese Mäuse sind immundefizient. Sie besitzen keinen Thymus und somit keine ausgereiften T-Lymphozyten oder Antikörper. Sie stoßen Fremdgewebe nicht ab, daher sind sie ein für onkologische Versuche häufig verwendeter Modellorganismus.

In der ersten Versuchsstufe wurden 1×10^6 U87-MG^{EGFR^{III}} in PBS mit 4×10^6 YTS-Effektorzellen in PBS vermischt und 100 μ l dieser Zellsuspension den Mäusen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Je 8 - 10 Mäuse pro Gruppe wurden auf diese Weise mit CAR-tragenden YTS sowie als Negativkontrollen mit YTS Wildtypzellen oder PBS allein behandelt. Der wachsende Tumor wurde aller fünf Tage mit einem elektronischen Messschieber in Länge und Breite vermessen und das Tumorareal mit der folgenden Formel bestimmt:

$$\text{Tumorareal [mm}^2\text{]} = \pi \times \frac{\text{Längsdurchmesser [mm]} \times \text{Querdurchmesser [mm]}}{4}$$

Formel 6 Berechnung des subkutanen Tumorareals *in vivo*

In der zweiten Versuchsstufe wurde ein bereits etablierter Tumor therapiert. 1×10^6 U87-MG^{EGFR^{III}} in 100 μ l PBS wurden subkutan in die rechte Flanke injiziert. Nach fünf Tagen waren die Tumorzellen angewachsen und es wurde mit einer systemischen Therapie begonnen. Aller zwei Tage wurden 4×10^6 YTS-Effektorzellen in 100 μ l PBS in die Schwanzvene injiziert und das Tumorareal mit der oben genannten Formel bestimmt.

Der gleiche Versuchsaufbau wurde für die Analyse des *in vivo* Migrationsverhaltens von YTS Wildtyp bzw. YTS CXCR4 gewählt. Als Zielzellen dienten SDF-1 α sekretierende Gliomzellen bzw. mit EGFP transduzierte Kontrollzellen. Die YTS-Zellen wurden zusätzlich mit p6NST61_DsRed_Express2 transduziert. Nach drei Wochen wurden die Mäuse getötet, die Tumore entnommen, in Kryomedium eingebettet und am Kryotom 10 μ m dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden mit 4 % PFA fixiert (10 min, 4°C), dann für 10 min bei -20°C mit Aceton / Methanol-Gemisch (1:1) inkubiert, für 5 min bei 4°C mit PBS gewaschen und anschließend bei RT getrocknet. Zum Eindeckeln wurde Vectashield Mounting Medium mit

Dapi verwendet und die Schnitte mit Nagellack versiegelt. Die Analyse der Schnitte erfolgte am Fluoreszenzmikroskop LSM510 (Zeiss). Die DsRed-exprimierenden YTS-Zellen wurden gezählt und so das Einwanderungsverhalten von Wildtypzellen und CXCR4-positiven Zellen verglichen.

In der dritten Versuchsstufe wurden $1,5 \times 10^6$ U87-MG-Gliomzellen mit Koexpression von EGFRvIII und SDF-1 α subkutan injiziert. Nach fünf Tagen begann die systemische Therapie durch intravenöse Applikation von CAR-exprimierenden YTS oder YTS, die sowohl einen CAR als auch den CXCR4-Chemokinrezeptor trugen.

Die Mäuse wurden nach Ablauf des Untersuchungszeitraums durch CO₂-Begasung getötet oder wenn der Tumor eine Größe von mehr als 18 mm im Durchmesser erreichte. Zur Auswertung der Versuche wurden zum einen Kaplan-Meyer-Überlebenskurven erstellt (prozentuales Überleben der Gruppen über die Zeit) und mit einem Log Rank (Mantel Cox) - Test statistisch ausgewertet. Zum anderen wurde das durchschnittliche Tumorareal der Gruppen in mm² über die Zeit aufgetragen und mit einem einseitigen t-Test die statistische Signifikanz der Unterschiede in Größe der Tumoreale aufgrund verschiedener Behandlungsmethoden ermittelt.

3 ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN ZELLINIEN

Im Vorfeld der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten gentechnischen Veränderungen stand die Charakterisierung der verwendeten Zellen. Es wurde zum einen die Expression spezifischer Moleküle auf der Oberfläche von Tumorzelllinien, YTS-Zellen und primären humanen NK-Zellen analysiert, die zu einer Aktivierung oder Inhibition des zytotoxischen Potentials von NK-Effektorzellen führen könnten. Zum anderen wurde eine HLA-Typisierung durchgeführt, um eventuell auftretende Graft-versus-Tumor - (GVT) Effekte erklären zu können, die zusätzlich zu den eingesetzten chimären Rezeptoren die NK-Zell-Aktivität modulieren könnten.

3.1.1 Untersuchung von Oberflächenmarkern

Oberflächenmarker auf Tumorzelllinien, YTS und primären humanen NK-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie am MacsQuant (Miltenyi) und durch Färbung mit spezifischen Antikörpern untersucht. Die Daten wurden mit FlowJo (TreeStar, Ashland, USA) ausgewertet und das geometrische Mittel der Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß der Dichte der untersuchten Moleküle auf der Oberfläche der Zellen ermittelt. Es wurden nach Standardprotokoll (siehe Kapitel 2.5.5.1) drei unabhängige Färbungen durchgeführt und die MFI der jeweiligen Isotypkontrolle abgezogen. Von den drei Messungen wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung („standard deviation“, S.D.) berechnet.

3.1.1.1 Tumorzelllinien

Es wurde die Expression der in die Apoptose-Induktion involvierten Rezeptorpaare FasL und FasR sowie TRAIL, TRAIL-R1 (DR4) und TRAIL-R2 (DR5) untersucht, außerdem die Oberflächenexpression der Haupthistokompatibilitäts-Moleküle HLA-ABC sowie HLA-E. Zudem wurde überprüft, ob die Tumorzellen Stressproteine wie MIC-A/B exprimieren. Die Färbungen von jeweils 100.000 HEK 293T, U87-MG, U343-MG, BS153 und K562 erfolgten mit spezifischen Antikörpern nach Herstellerangaben und mit der jeweils passenden Isotypkontrolle. Alle Antikörper außer anti-MIC-A/B waren direkt PE- oder FITC-gekoppelt. Färbungen gegen MIC-A/B wurden anschließend mit einem sekundären anti-Maus-Cy3-Antikörper (1:10 verdünnt) gefärbt.

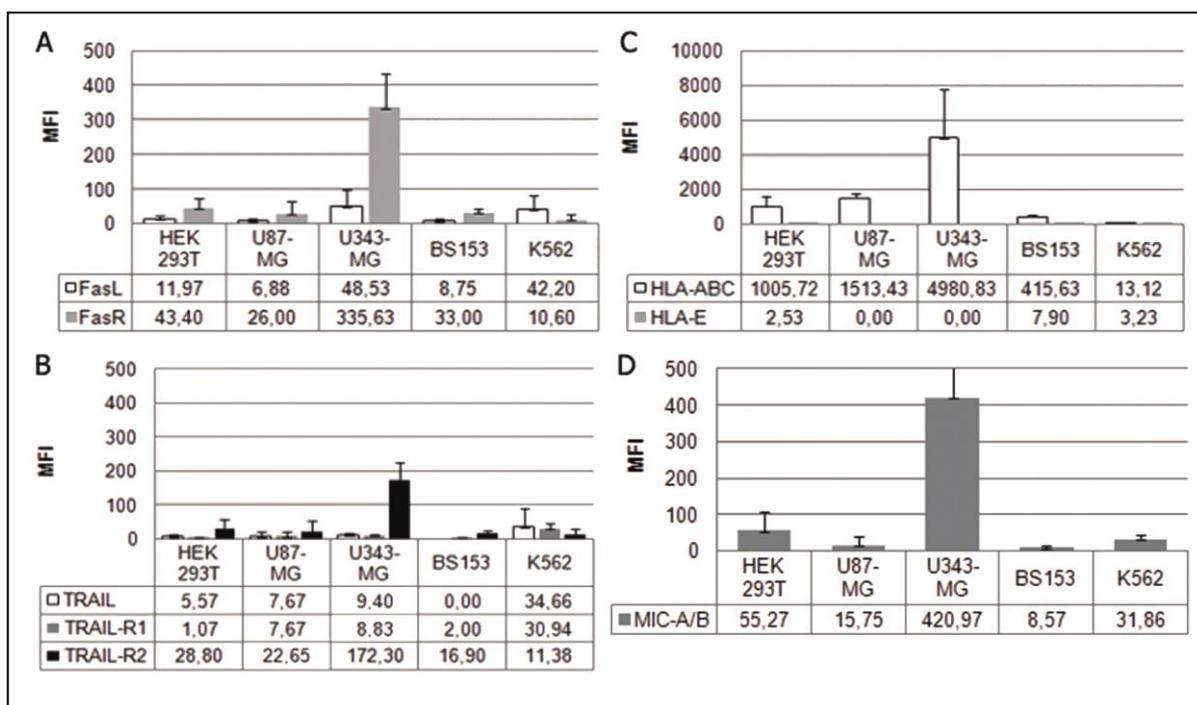


Abbildung 6 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker auf Tumorzelllinien.

HEK 293T, U87-MG, U343-MG, BS153 sowie K562 wurden mittels Antikörperfärbungen auf die Expression von A) Todesrezeptor FasR und seinem Liganden FasL B) den apoptoseinduzierenden Ligand TRAIL sowie seine Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2, C) die Haupthistokompatibilitätskomplex-Moleküle HLA-ABC und HLA-E D) sowie die Stressproteine MIC-A/B untersucht. Es wurden drei unabhängige Färbungen durchgeführt und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Isotypkontrolle von den korrespondierenden Werten abgezogen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus drei Versuchen.

Die Abbildung 6A zeigt, dass auf der Oberfläche aller untersuchten Tumorzelllinien eine geringe FasL-Expression nachweisbar war. Der Todesrezeptor FasR wurde ebenfalls von allen Zelllinien exprimiert. Besonders stark war die Expression bei U343-MG. K562 exprimierten den FasR hingegen nur in geringem Maße. In Abbildung 6B wird ersichtlich, dass bis auf eine geringe Expression bei K562 keine der Tumorzelllinien TRAIL exprimiert. Auch TRAIL-R1 (DR4) wurde ausschließlich von K562 exprimiert, TRAIL-R2 (DR5) hingegen von fast allen Tumorzellen (außer K562). Auch hier war die Expression bei U343-MG am stärksten. Bis auf die K562 waren alle Tumorzellen HLA-ABC positiv (siehe Abbildung 6C), HLA-E wurde hingegen kaum exprimiert. Für die Stressproteine MIC A/B wurden laut Abbildung 6D bis auf U343-MG in den Zelllinien nur geringe Expressionslevel nachgewiesen.

3.1.1.2 YTS und primäre humane NK-Zellen

Für die Charakterisierung der YTS-Zellen wurde die Oberflächenexpression von typischen NK-Zellmarkern, von Molekülen, die für Migration und Diapedese benötigt werden, sowie inhibierenden und aktivierenden Rezeptoren mit der Expression auf den primären humanen NK-Zellen von drei verschiedenen gesunden Spendern verglichen. Die primären NK-Zellen wurden nach der Isolation expandiert, aktiviert (siehe Kapitel 2.5.1.2) und für

14 Tage kultiviert. Die Färbungen von jeweils 100.000 Zellen erfolgten mit spezifischen Antikörpern nach Herstellerangaben und mit der jeweils passenden Isotypkontrolle. Alle Antikörper waren direkt PE-, FITC- oder APC-gekoppelt.

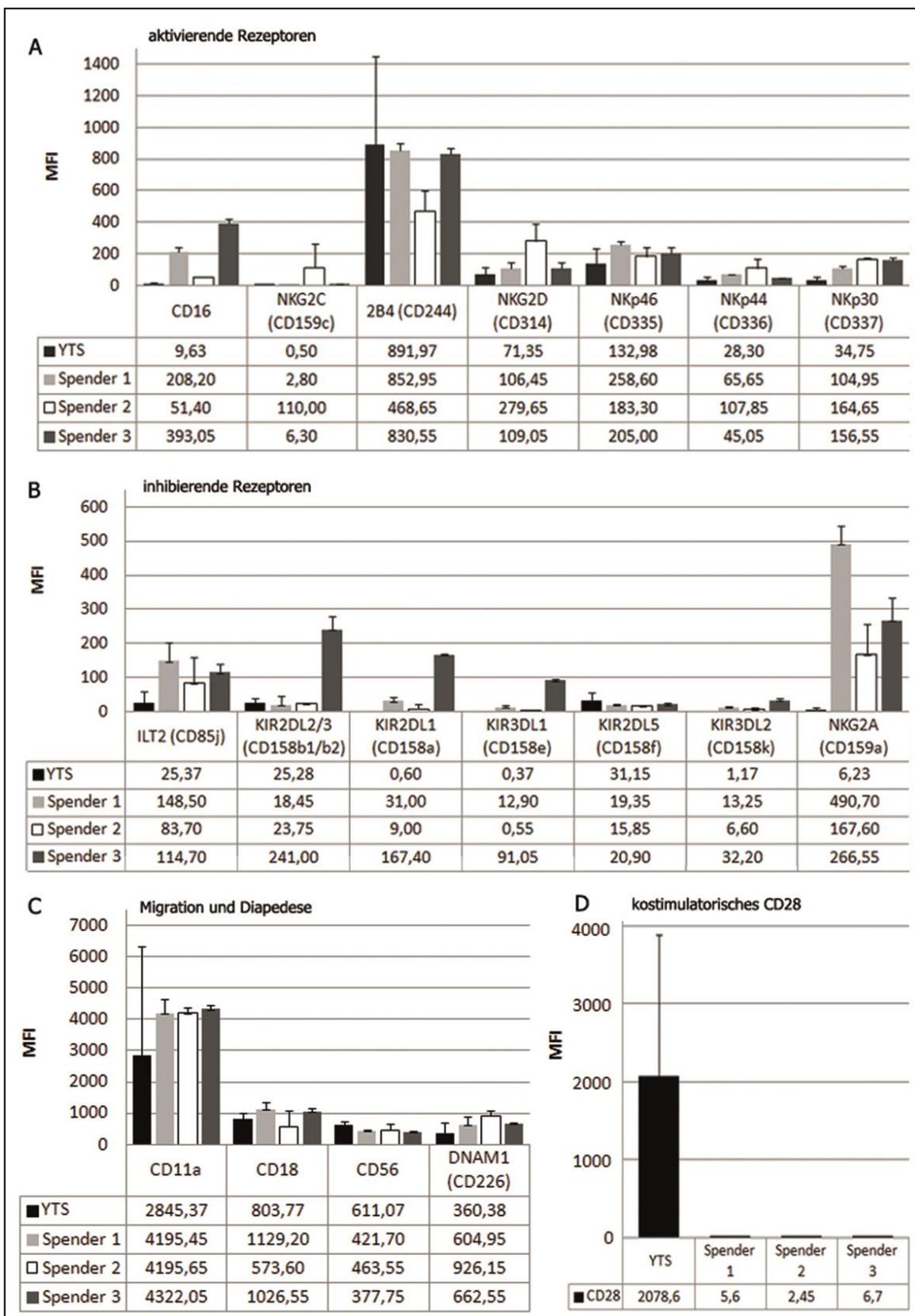


Abbildung 7 Durchflusszytometrische Analyse der MFI von Oberflächenmarkern bei YTS und primären humanen NK-Zellen. YTS-Zellen sowie primäre humane NK-Zellen von drei gesunden Spendern wurden mittels Antikörperfärbungen auf die Expression von A) aktivierenden NK-Zell-Rezeptoren CD16, NKG2C, 2B4, NKG2D, NKp46, NKp44 und NKp30 B) inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren ILT2, KIR2DL2/3, KIR2DL1, KIR3DL1, KIR2DL5, KIR3DL2 und NKG2A C) Molekülen für Migration und Diapedese CD11a, CD18, CD56 und DNAM1 sowie D) dem kostimulatorischen Molekül CD28 untersucht. Es wurden drei unabhängige Färbungen durchgeführt und von diesen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der jeweiligen Isotypkontrolle abgezogen. Die Abbildung zeigt den Mittelwert aus drei Versuchen.

In Abbildung 7B wird erkennbar, dass YTS-Zellen geringe Mengen der inhibierenden Rezeptoren KIR2DL2/3 und KIR2DL5 sowie CD244 exprimieren. Letzteres kann – je nach Länge des intrazytoplasmatischen Teils – sowohl aktivierend (S, d. h. kurz) als auch inhibierend (L, d. h. lang) wirksam werden. Die beiden CD244-Subtypen können vom verwendeten Antikörper nicht unterschieden werden. Daher kann keine Aussage getroffen werden, welcher Subtyp bei den YTS-Zellen vorliegt. An aktivierenden Rezeptoren wurde eine Expression von NKG2D sowie NKp30 und NKp46 gezeigt (siehe Abbildung 7A). Außerdem wurden, wie in Abbildung 7C dargestellt, CD11a, DNAM-1, CD18 und der NK-Zellmarker CD56 sowie, laut Abbildung 7D, CD28 nachgewiesen.

Es wurden NK-Zellen von drei gesunden Spendern untersucht. Abbildung 7C zeigt, dass die NK-Zellen aller Spender die für NK-Zellen typischen Marker CD11a, DNAM-1, CD18 und CD56 exprimierten, sowie CD16 und CD244. Die aktivierenden Rezeptoren NKG2A, NKG2D, NKp30, NKp44 und NKp46 wurden ebenfalls exprimiert (siehe Abbildung 7A). Alle primären NK-Zellen waren, wie in Abbildung 7D gezeigt wird, CD28-negativ. Bei Spender 1 lagen dazu eine starke Expression des inhibierenden Rezeptors CD85j sowie moderate Expressionslevel von KIR2DL5, KIR2DL1, KIR3DL1 und KIR3DL2 (siehe Abbildung 7B) vor. Spender 2 zeigte eine Expression der inhibierenden Rezeptoren KIR2DL5, KIR2DL2/3 und ein geringes Expressionslevel von CD85j (siehe Abbildung 7B). Spender 3 wiederum verfügte über sehr hohe Expressionslevel der inhibierenden Rezeptoren KIR2DL2/3, CD85j, KIR2DL1 und moderate Level von KIR2DL5 sowie KIR3DL2 (siehe Abbildung 7B).

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte, dass primäre humane NK-Zellen aufgrund der genetischen Variabilität der Spender mit verschiedenen und unterschiedlich stark exprimierten Rezeptoren ausgestattet sind. Zusätzlich konnte mit diesen Färbungen nachgewiesen werden, dass YTS mit primären NK-Zellen wesentliche Merkmale gemein haben, was sie als eine NK-Zelllinie definiert.

3.1.2 HLA-Typisierung

Um die gegen EGFRvIII gerichtete Zytotoxizität der NK-Zellen auf die eingebrachten chimären Rezeptorkonstrukte zurückführen bzw. eine eventuelle unspezifische Lyse als Graft-versus-Host - Effekt erkennen zu können, wurden sowohl die parentalen Tumorzelllinien als auch die Effektorzellen YTS und die primären humanen NK-Zellen HLA-typisiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 36 und 37 dargestellt.

3.1.2.1 Tumorzelllinien

Alle Typisierungen wurden von Dr. Monika Füssel (DKMS Dresden) auf molekulargenetischer Basis durch Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe Kapitel 2.3.7) mit der aus den Zellen isolierten DNA (siehe Kapitel 2.3.4) durchgeführt. Die U87-MG^{EGFRvIII}, welche freundlicherweise von Dr. Frank Funari (La Jolla University, California, USA) zur Verfügung gestellt worden waren, wurden ebenfalls typisiert. Sie stimmten in ihrem HLA-Status mit den U87-MG Wildtypzellen aus unserem Labor überein und werden daher nicht noch einmal gesondert aufgeführt.

Tabelle 36 HLA-Typisierung Tumorzelllinien

	HEK 293T	U87-MG	U343-MG	BS153	K562*
HLA-A	*02:01	*02:01	*02:01, *03:01	*01:01, *02:01	*11:01, *31:01
HLA-B	*07:02	*44:02	*07:02, *47:01	*44:03, *57:01	*18, *40
HLA-C	*07:02	*05:01	*06:02, *07:02	*03:04, *06:02	*03
HLA-DRB1				*07:01	*03, *04
HLA-DQB1				*02:02, *03:03	*02:01, *03:02

*aus: *Adams2005*

3.1.2.2 YTS und primäre humane NK-Zellen

Alle Typisierungen wurden von Dr. Monika Füssel (DKMS Dresden) auf molekulargenetischer Basis durch Polymerasekettenreaktion (PCR, siehe Kapitel 2.3.7) mit der aus den Zellen isolierten DNA (siehe Kapitel 2.3.4) durchgeführt. Spender 3 stimmte einer HLA-Typisierung nicht zu, daher konnten diese Daten nicht erhoben werden.

Tabelle 37 HLA-Typisierung YTS und primäre humane NK-Zellen

	YTS	Spender 1	Spender 2	Spender 3
HLA-A	*26, *31	*02, *03	*03, *11	HLA-Status wurde nicht bestimmt
HLA-B	*48, *55:02	*35, *57:01	*07, *40	
HLA-C	*01, *08	*04, *06:02	*07, *02	
HLA-DRB1		*01:01, *07:01	*04:01, *15:01	
HLA-DQB1		*03:03, *05:01	*03:02, *06:02	

3.2 KLONIERUNGSSTRATEGIEN UND SCHEMATA DER EINGESETZTEN VEKTOREN

Nach der Charakterisierung der Zellen wurden diese gentechnisch verändert. Dieses Kapitel gibt einen Überblick über den Aufbau und die Herstellung der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Rezeptorkonstrukte.

Die Tumorzelllinien wurden mit lentiviralen Viruspartikeln transduziert (siehe Kapitel 2.5.4), welche die genetische Information für die Expression von EGFRvIII und Sekretion von SDF-1 α sowie eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker enthielten. Parallel dazu wurden HT1080-Zellen mit Expressionsplasmiden für EGFRvIII und SDF-1 α transduziert, die statt der Antibiotikaresistenz den Expressionsmarker EGFP trugen, um den Virustiter des für die Transduktion verwendeten Zellkulturüberstandes zu bestimmen (siehe Kapitel 2.5.4.3).

Die YTS-Zellen und die primären humanen NK-Zellen wurden mit lentiviralen Viruspartikeln transduziert (siehe Kapitel 2.5.4), welche die genetische Information für die Expression des chimären Antigenrezeptors Ig κ _MR1.1_DAP12 bzw. der dazugehörigen Kontrollkonstrukte (Ig κ _DAP12, Ig κ _MR1.1_DAP12^{mut}) sowie eine Antibiotikaresistenz als Selektionsmarker enthielten. Außerdem wurden YTS-Zellen und primäre humane NK-Zellen mit lentiviralen Viruspartikeln transduziert (siehe Kapitel 2.5.4), welche die genetische Information für die Expression des CXCR4-Chemokinrezeptors samt Selektionsmarker enthielten. Parallel dazu wurden HT1080-Zellen mit den gleichen Expressionsplasmiden transduziert, die aber statt der Antibiotikaresistenz den Expressionsmarker EGFP trugen, um den Virustiter des für die Transduktion verwendeten Zellkulturüberstandes zu bestimmen (siehe Kapitel 2.5.4.3).

3.2.1 Expressionsplasmide für die Modifizierung von Tumorzelllinien

3.2.1.1 Expressionsplasmid für EGFRvIII

Die DNA-Sequenz für den EGFRvIII mit geeigneten Restriktionsschnittstellen stellte die Firma MWG Biofins bereit. Das gelieferte Plasmid pCR2.1_EGFRvIII wurde mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI behandelt, um das für EGFRvIII kodierende DNA-Fragment zu isolieren. Dieses DNA-Fragment wurde anschließend in die multiple Klonierungssequenz („multiple cloning site“, MCS) des mit den gleichen Enzymen linearisierten Expressionsplasmids pHATtrick-puroR ligiert (siehe Kapitel 2.3.1). Dieses vermittelt über das PAC-Gen (*Lacalle1989*) eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin, das aus dem Pilz *Streptomyces alboniger* stammt und die eukaryotische und prokaryotische Proteinsynthese hemmt (*Darken1964*). Innerhalb weniger Stunden können mit diesem Antibiotikum Zellen eliminiert werden, die nach Transduktion nicht den eingebrachten Vektor mit dem passenden Resistenzgen exprimieren. Eine ausführliche Vektorkarte des Plasmids pHATtrick-puroR befindet sich im Anhang. Parallel dazu wurde

für eine fluoreszenzanalytische Virustiterbestimmung (siehe Kapitel 2.5.4.3) ein Plasmid mit EGFP-Markergen mit der gleichen Vorgehensweise kloniert.

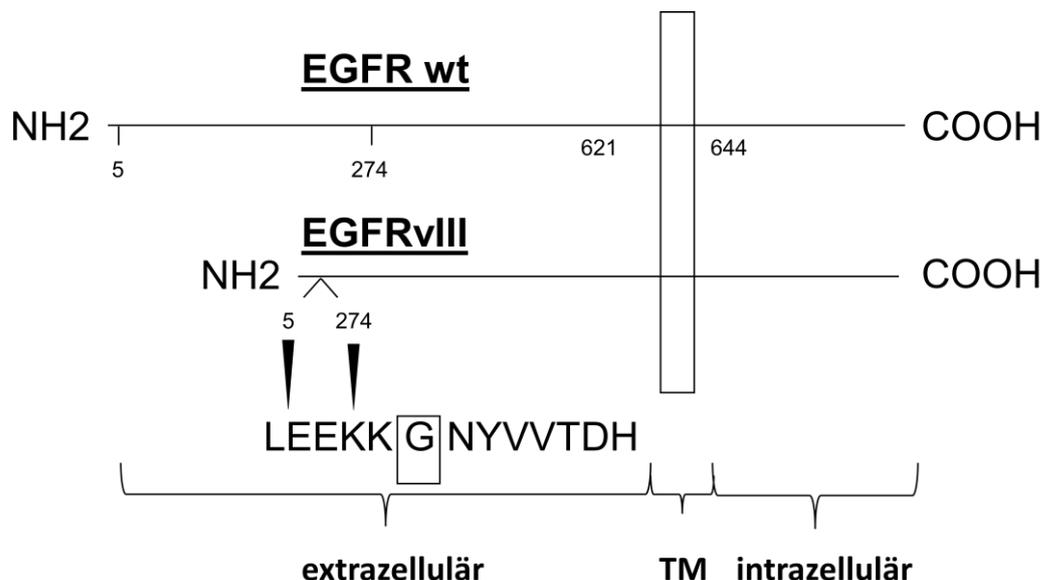


Abbildung 8 Schemata von EGFR wt und EGFRvIII. Der EGFRvIII zeigt im Gegensatz zum EGFR wt eine Deletion von mRNA-Exon 2 bis 7. Daraus resultiert das Neoepitop PEPvIII (LEEKKGNYYVTDH), das durch spezifische Antikörper erkannt werden kann.

3.2.1.2 Expressionsplasmid für SDF-1 α

Den Vektor p6NST50-SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR stellte freundlicherweise Dr. Marc Cartellieri (TU Dresden, Institut für Immunologie) zur Verfügung. Den schematischen Aufbau des Vektors zeigt Abbildung 9. Eine ausführliche Vektorkarte findet sich im Anhang.

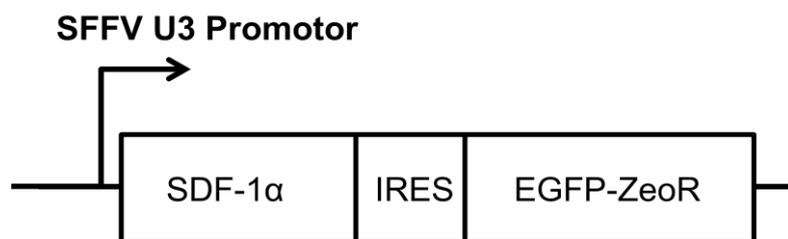


Abbildung 9 Schema des SDF-1 α -Expressionsplasmids. Die Kassette kodiert für das Chemokin SDF-1 α , dessen Expression durch den SFFV U3 Promoter gesteuert wird. Außerdem verfügt sie über eine „internal ribosomal entry site“ für ein EGFP-gekoppeltes Zeocinresistenzgen.

SFFV U3: Spleen Focus-Forming Virus Promoter

IRES: erlaubt die Translationsinitiation in der Mitte einer mRNA, somit wird das Ablesen von Einzelproteinen möglich

EGFP-ZeoR: Fluoreszenzmarkergen fusioniert an ein Zeocin-Resistenzgen

3.2.2 Expressionsplasmide für die Modifizierung von Effektorzellen

3.2.2.1 Expressionsplasmide für den CXCR4-Chemokinrezeptor

Ein Expressionsplasmid mit der DNA-Sequenz für den Chemokinrezeptor CXCR4 wurde freundlicherweise von Dr. Sebastian Brenner (Universitätsklinikum „Carl Gustav Carus“ der TU Dresden, Kinderklinik) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe von sequenzspezifischen Oligonukleotiden CXCR4_for und CXCR4_rev wurde eine PCR (siehe Kapitel 2.3.7) mit dem Vektor MFGS-CXCR4 als Matrize durchgeführt. Dabei wurden die Primer so gewählt, dass benötigte Restriktionsstellen flankierend zum CXCR4-ORF eingebracht, sowie das 3'-gelegene Stop-Codon entfernt wurden. Das entstandene 1.059 bp große Fragment wurde nach Gelelektrophorese eluiert und in pCR2.1 subkloniert, um mittels Blau-Weiß-Selektion (siehe Kapitel 2.2.4) Bakterienkolonien zu identifizieren, die ein ligiertes Plasmid aufgenommen hatten. Abschließend wurde das verifizierte DNA-Fragment mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI aus pCR2.1_CXCR4 gewonnen und in die MCS des linearisierten Vektors pHATtrick-puroR ligiert (siehe Kapitel 2.3.1 und Anhang).

Außerdem wurde ein Expressionsplasmid generiert, das statt des Puromycin-Resistenzgens über das Hph-Gen von *Escherichia coli* eine Hygromycin-Resistenz vermittelt. Dieses Gen kodiert für eine Hygromycin B Phosphotransferase, die das Antibiotikum zu 7"-O-Phosphoryl-Hygromycin B phosphoryliert und somit inaktiviert (*Pardo1985*). Für die Klonierung wurden mit den sequenzspezifischen Oligonukleotiden HygroR_for und HygroR_rev in einer PCR 5'-terminal eine KpnI und 3'-terminal eine EcoRV Schnittstelle an die Hygromycinsequenz angefügt (siehe Kapitel 2.3.7). Das entstandene 1.050 bp große Fragment wurde in pCR2.1 subkloniert und mittels Blau-Weiß-Selektion (siehe Kapitel 2.2.4) überprüft. Anschließend erfolgte ein präparativer Verdau von pHATtrick-puroR-CXCR4 und pCR2.1-HygroR mittels KpnI und EcoRV. Die entstandenen Fragmente wurden zu pHATtrick-hygroR-CXCR4 ligiert (siehe Kapitel 2.3.1). Die beiden Chemokinrezeptoren sind schematisch in Abbildung 10 dargestellt. Parallel zu diesen Rezeptoren wurden für eine fluoreszenzanalytische Virustiterbestimmung (siehe Kapitel 2.5.4.3) Plasmide mit EGFP-Markergen mit der gleichen Vorgehensweise aus den entsprechenden Ausgangsplasmiden kloniert.

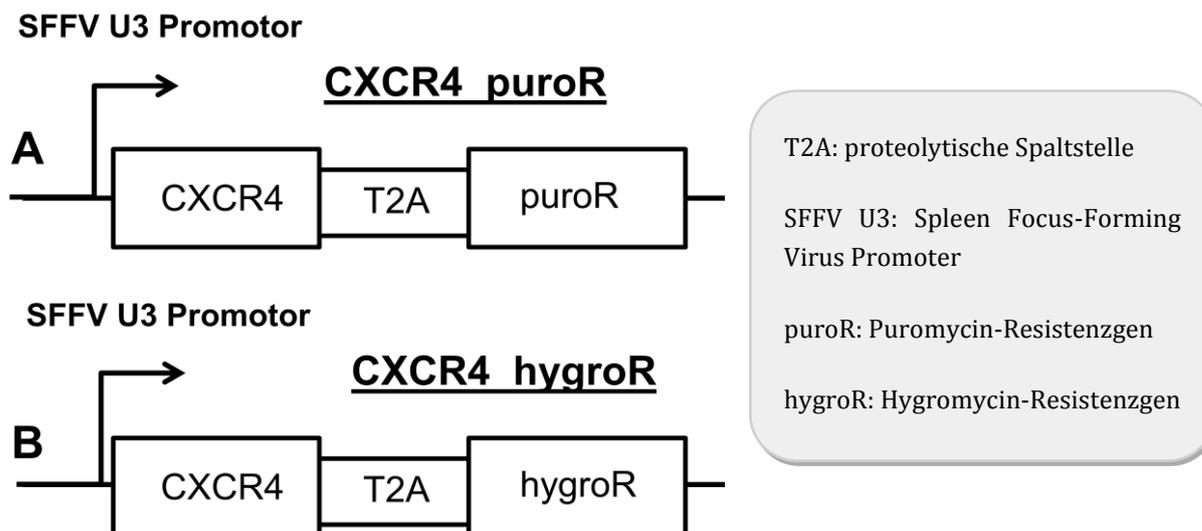


Abbildung 10 Schemata der CXCR4-Chemokinrezeptoren. Die Kassette kodiert für den Chemokinrezeptor CXCR4, dessen Expression durch den SFFV U3 Promoter gesteuert wird. Außerdem verfügt sie über eine proteolytische Spaltstelle (T2A) und A) ein Puromycin- bzw. B) ein Hygromycin-Resistenzgen.

3.2.2.2 Expressionsplasmide für chimäre Antigenrezeptoren

Die Antgenspezifität eines chimären Antigenrezeptors (CAR) wird durch den N-terminal gelegenen Einzelkettenantikörper-Anteil (scFv) determiniert. Der scFv als Antigenbindestruktur besteht aus der leichten und schweren Kette eines Einzelkettenantikörpers, die üblicherweise durch einen Glycin-Serin-Linker miteinander verbunden sind.

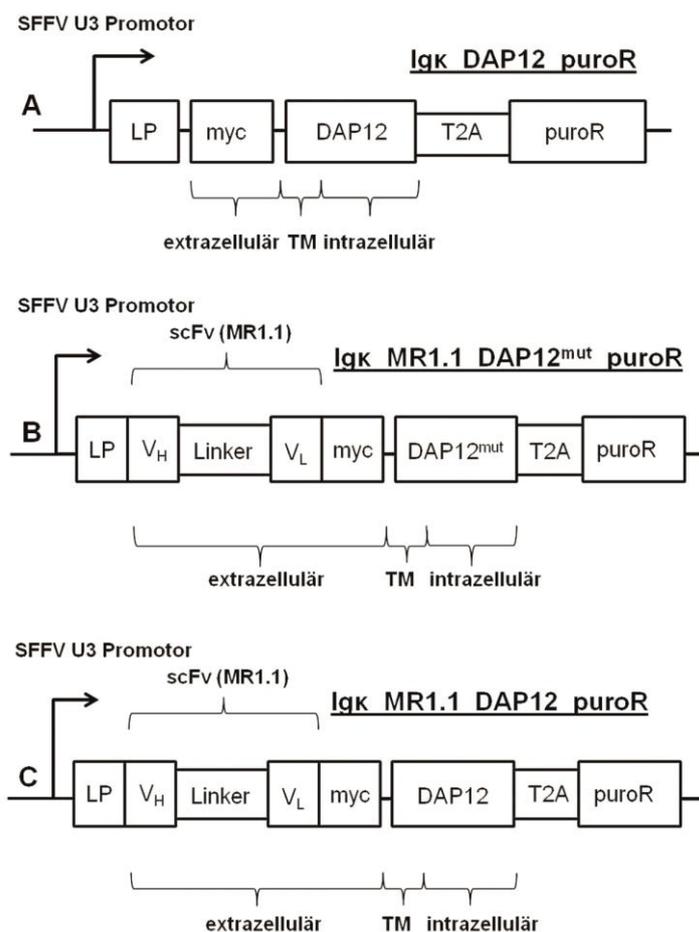
Der chimäre Antigenrezeptor Ig κ _DAP12 ist ein Kontrollkonstrukt, das zwar die Signaluntereinheit DAP12 trägt, aber keine Antigenbindestruktur besitzt. Dessen Expressionsplasmid wurde, ebenso wie das Expressionsplasmid des zweiten Kontrollkonstrukts Ig κ _DAP12^{mut}, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Achim Temme generiert. Die ursprüngliche Sequenz für DAP12 lieferten das I.M.A.G.E. Konsortium und das Deutsche Ressourcenzentrum für Genomforschung GmbH.

Der komplette und funktionelle chimäre Antigenrezeptor Ig κ _MR1.1_DAP12 verfügt zudem über den scFv-Anteil der variablen Ketten des monoklonalen anti-EGFRvIII-Antikörpers MR1.1. Er kann an das PEPvIII-Epitop binden und führt über DAP12 zur Weiterleitung eines aktivierenden Signals in die Effektorzelle.

Zunächst wurde aus dem pSeqTag-MR1.1-BAP über eine spezifische 2-Step-PCR (siehe Kapitel 2.3.7) die Sequenz des scFv(MR1.1) isoliert. In einem ersten Schritt wurden die Oligonukleotide MR1.1_for und MR1.1_rev eingesetzt. Der PCR-Ansatz wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und das entstandene Fragment von 712 bp aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 2.3.1.3). Das Eluat wurde in pCR2.1 subkloniert und nach einer Blau-Weiß-Selektion (siehe Kapitel 2.2.4) die DNA eines passenden Klons für einen zweiten PCR-Schritt

weiterverwendet. Über das Oligonukleotid Igκ_MR1.1_for wurde dem PCR-Fragment 5'-terminal das Leaderpeptid Igκ angefügt. Nach erneuter Gelelektrophorese wurde das entstandene 800 bp große Fragment aus Igκ-Leaderpeptid und scFv(MR1.1) eluiert und in pCR2.1 subkloniert.

In einem anschließenden präparativen Restriktionsverdau wurden pHATtrick-puroR-Igκ_DAP12 und pCR2.1-Igκ_MR1.1 mit den Restriktionsenzymen SphI und AgeI linearisiert und die beiden DNA-Fragmente miteinander zu pHATtrick-puroR-Igκ_MR1.1_DAP12 verknüpft (siehe Kapitel 2.3.1). Um das Kontrollkonstrukt mit nichtfunktionellem DAP12 (pHATtrick-puroR-Igκ_MR1.1_DAP12^{mut}) zu generieren, wurde der entsprechende pHATtrick-puroR-Igκ_DAP12^{mut} verwendet und ebenso verfahren. Die Schemata der Rezeptorkonstrukte sind in Abbildung 11 dargestellt. Parallel zu diesen Rezeptoren wurden für eine fluoreszenzanalytische Virustiterbestimmung (siehe Kapitel 2.5.4.3) Plasmide mit EGFP-Markergen mit der gleichen Vorgehensweise aus den entsprechenden Ausgangsplasmiden kloniert.



SFFV U3: Spleen Focus Forming-Virus Promoter

LP: Igκ-Leaderpeptid

myc: Polypeptid abgeleitet vom c-myc Gen, verwendet als Protein-Tag zur Detektion

T2A: proteolytische Spaltstelle

puroR: Puromycin-Resistenzgen

TM: Transmembrandomäne

Linker: Glycin-Serin-Aminosäurelinker

V_H: schwere Kette des Einzelkettenantikörpers

V_L: leichte Kette des Einzelkettenantikörpers

scFv(MR1.1): anti-EGFRvIII-Einzelkettenantikörper

DAP12: Signaluntereinheit

DAP12^{mut}: nichtfunktionelle Signaluntereinheit mit mutiertem ITAM

Abbildung 11 Schemata der chimären Antigenrezeptorkonstrukte. Die Kassetten kodieren für A) Igκ_DAP12 als verkürzten Rezeptor mit funktioneller Signaluntereinheit, aber ohne Antigenbindestruktur, B) Igκ_MR1.1_DAP12^{mut} als Kontrollkonstrukt mit Antigenbindestruktur aus den variablen Ketten des EGFRvIII-spezifischen Antikörpers MR1.1 und mutiertem DAP12. Zwei Tyrosinreste wurden gegen Serin ausgetauscht, so dass nach Antigenbindung keine Signalweiterleitung erfolgt. C) Igκ_MR1.1_DAP12 als den funktionellen chimären Antigenrezeptor mit kompletter Signaluntereinheit und Antigenbindestruktur. Die Expression wird durch den SFFV U3 Promoter gesteuert. Alle Vektoren tragen eine proteolytische Spaltstelle (T2A), einen myc-Tag und ein Puromycin-Resistenzgen.

3.3 HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON SDF-1A SEKRETIERENDEN UND EGFRVIII-POSITIVEN TUMORZELLEN

Die in Kapitel 3.1 charakterisierten Tumorzelllinien wurden in einem nächsten Schritt gentechnisch verändert. Sie sollten zum einen den EGFRvIII exprimieren (siehe Kapitel 3.2.1.1) und zum anderen das Chemokin SDF-1α ins Medium sekretieren (siehe Kapitel 3.2.1.2). Dieses Kapitel beschreibt die Herstellung sowie Charakterisierung dieser Tumorzelllinien.

3.3.1 Nachweis der EGFRvIII-Expression

3.3.1.1 Nachweis der EGFRvIII-mRNA

Die Zelllinie U87-MG^{EGFRvIII} exprimierte bereits den EGFRvIII. Auch die freundlicherweise von Dr. Alexander Schulte und Dr. Katrin Lamszus (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) zur Verfügung gestellten BS153 und BS153^{resE} – Zellen lagen bereits mit EGFRvIII-Expression vor. Die Tumorzelllinien HEK 293T und U343-MG wurden mit lentiviralen Viruspartikeln transduziert, die für den pHATtrick-puroR-EGFRvIII kodierten, und anschließend mit Puromycin für 24 h selektiert (siehe Kapitel 2.5.4). Um zu zeigen, dass die Transduktion der Zielzellen mit dem EGFRvIII-Expressionsplasmid tatsächlich zu einer Integration ins Genom der Zellen und somit zur Ablesung von EGFRvIII-mRNA führt, wurde eine Kontroll-PCR entwickelt (siehe Kapitel 2.3.7). Gesamt-mRNA wurde aus den Lysaten der Tumorzelllinien isoliert und in cDNA umgeschrieben (siehe Kapitel 2.3.5 und 2.3.6). Um eine Kontamination mit genomischer DNA auszuschließen, wurde vor der eigentlichen EGFRvIII-spezifischen PCR eine PCR mit MECL-Primern (siehe Tabelle 19) durchgeführt. Die Oligonukleotide EGFRvIII_seq_for und EGFRvIII_rev wurden so entworfen, dass sie zum einen am Start-ATG binden und zum anderen in der mittleren Region der Sequenz. Da diese beiden Sequenzen bei EGFRvIII und EGFR wt gleich sind, entstanden zwei unterschiedlich lange PCR-Fragmente, je nachdem welcher Rezeptortyp vorlag. Der EGFRvIII führte zu einem 1.400 bp großen Fragment, der EGFR wt zu einem 2.500 bp großen Fragment. Abbildung 12 zeigt ein Gelelektrophoresebild (siehe Kapitel 2.3.1.3) mit dem PCR-Produkt aller im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Tumorzelllinien.

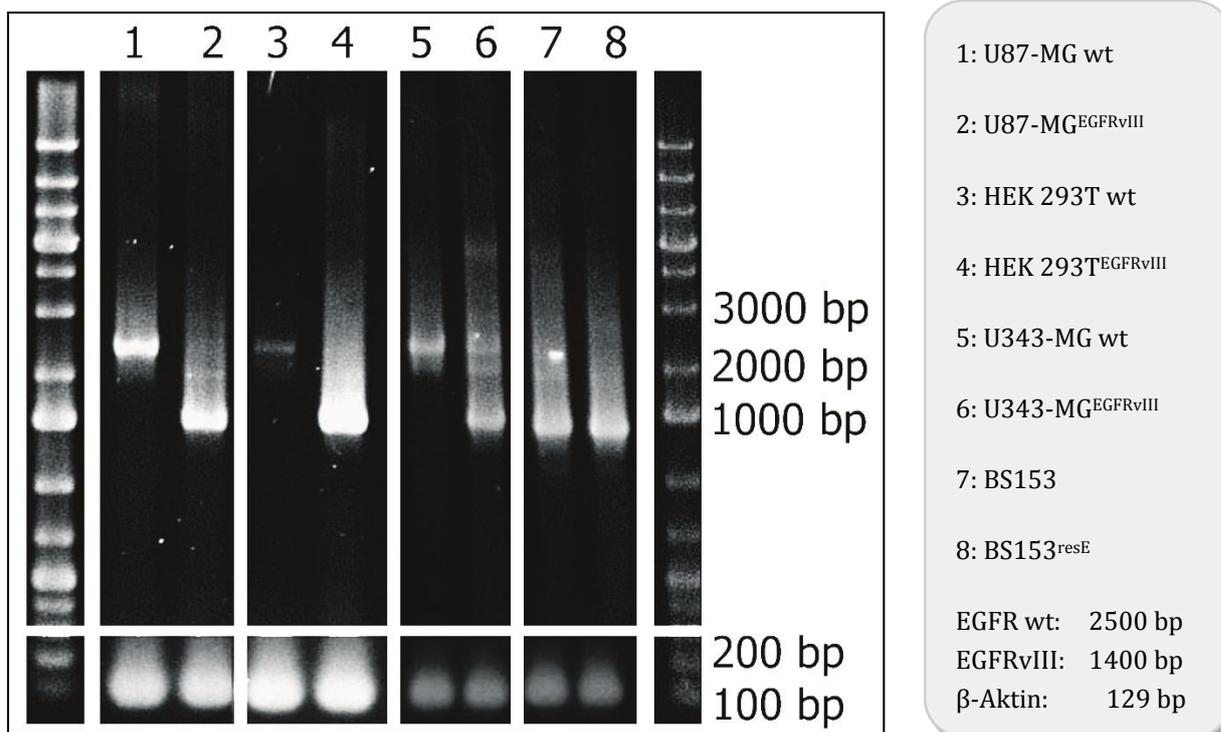


Abbildung 12 PCR zum Nachweis von EGFRvIII-mRNA in den Tumorzelllinien. Eine spezifische PCR mit revers transkribierter mRNA aus den verwendeten Tumorzelllinien diente zum Nachweis von EGFRvIII oder EGFR wt in diesen Zellen. Das entstandene PCR-Produkt wurde per Agarosegelelektrophorese analysiert. Ein 1.400 bp großes Fragment entstand, wenn in den Zellen EGFRvIII-mRNA vorlag, ein 2.500 großes Fragment, wenn EGFR wt-mRNA vorlag. Die mitgeführte β-Aktin-Kontrolle erlaubt eine Vergleichbarkeit der PCR-Produkte in den jeweiligen Zelllinien.

Die PCR erbrachte den Nachweis, dass die Zellen, die mit EGFRvIII transduziert worden waren, die mRNA dieser verkürzten Rezeptorvariante stark exprimierten, während Wildtyp-Zellen nur die mRNA des größeren EGFR wt exprimierten. BS153 waren dahingehend eine Ausnahme, da sowohl die parentalen Zellen als auch die Erlotinib-resistenten BS153^{resE} die kürzere Variante exprimierten, wie für diese Zellen auch beschrieben. In den EGFRvIII-positiven Zellen war kaum noch EGFR wt nachweisbar (nur ein wenig bei U343-MG). Dies ist wahrscheinlich darin begründet, dass zum einen EGFR wt nur schwach exprimiert wurde (außer bei HEK 293T). Zum anderen wurden die beiden Rezeptortypen in der PCR mit den gleichen Primern nachgewiesen. Dabei wurde anscheinend bevorzugt der kürzere EGFRvIII amplifiziert. Parallel zur EGFRvIII-PCR wurde eine PCR mit Primern gegen β-Aktin als „housekeeping“-Gen mitgeführt, bei der in allen Fällen ein 129 bp großes PCR-Produkt entstand. Das „housekeeping“-Gen ermöglicht den Vergleich der mRNA-Level in den Zellen. Ist die Bandenstärke des β-Aktin-PCR-Produkts in den Wildtyp-Zellen und den EGFRvIII-positiven Zellen gleich stark, korrelieren auch die Expressionsstärken der mRNA für EGFR wt und EGFRvIII. In den parentalen und den mit EGFRvIII modifizierten Zelllinien ist die Stärke der PCR-Banden jeweils vergleichbar, doch zeigen sich Unterschiede in den verschiedenen Zelllinien. So haben die Zelllinien U87-MG und HEK 293T wesentlich mehr EGFRvIII-mRNA als die Zelllinien U343-MG und BS153. Nachdem gezeigt wurde, dass alle

modifizierten Tumorzelllinien das Transkript für den EGFRvIII bildeten, wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob der EGFRvIII auch translatiert und an der Oberfläche der Tumorzelllinien exprimiert wird.

3.3.1.2 Nachweis der EGFRvIII-Oberflächenexpression

Da kommerzielle anti-EGFRvIII-Antikörper keine zufriedenstellenden Ergebnisse in der Durchflusszytometrie erbrachten, wurde ein gegen EGFRvIII gerichteter Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1) selbst erzeugt. Der aus dem Zellkulturüberstand (ZKÜ) von transient mit pSeqTag-MR1.1-BAP transfizierten HEK 293T aufgereinigte Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1) (siehe Kapitel 2.4.1) wurde mittels Immunoblot überprüft (siehe Kapitel 2.4.5). Hierfür wurde das aufgereinigte Protein auf ein 12%iges Acrylamid-Gel aufgetragen und nach Blot auf eine PVDF-Membran über den His-Tag des scFv(MR1.1) mit den Antikörpern Maus-anti-His und anti-Maus-HRP nachgewiesen (siehe Kapitel 2.4.6).

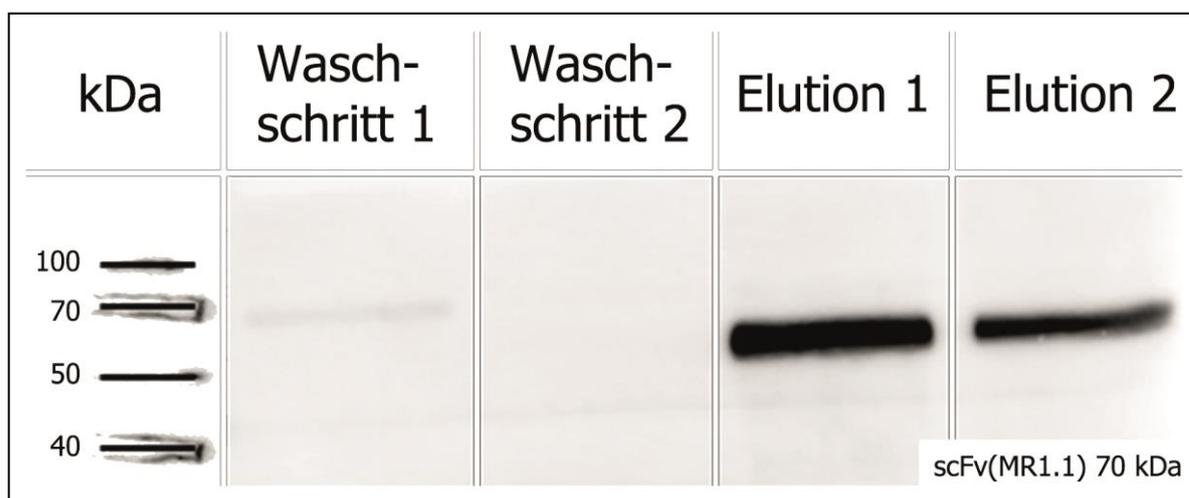


Abbildung 13 Immunoblot des aufgereinigten scFv(MR1.1). Die Waschfraktionen sowie Eluate der Aufreinigungsschritte des Zellkulturüberstands von mit pSeqTag-MR1.1-BAP transfizierten HEK 293T wurden in einer Immunoblot-Analyse untersucht. Über seinen His-Tag wurde der sekretierte, 70 Kilodalton (kDa) große Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1) proteinbiochemisch nachgewiesen. Hierfür wurden ein anti-His-Antikörper und ein passender sekundärer HRP-Antikörper eingesetzt.

In Elution 1 und 2 war der Einzelkettenantikörper eindeutig detektierbar, so dass diese aufgereinigten Eluate (nach einer Konzentrationsbestimmung wie in Kapitel 2.4.3) dafür eingesetzt werden konnten, in weiteren durchflusszytometrischen Messungen den EGFRvIII auf Zielzellen nachzuweisen.

Der Nachweis des EGFRvIII-Rezeptors erfolgte durchflusszytometrisch mit 5 µg des selbst produzierten scFv(MR1.1) sowie anti-c-myc-Biotin und anti-Biotin-PE Antikörpern (1:15 verdünnt). Jeweils 100.000 Tumorzellen wurden mit den Antikörpern inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert. Nur mit Sekundärantikörpern gefärbte Zellen dienten als

Negativkontrolle. Diese Überprüfung von Tumorzelllinien wurde regelmäßig vor jedem experimentellen Ansatz durchgeführt. Abbildung 14 zeigt eine repräsentative Färbung.

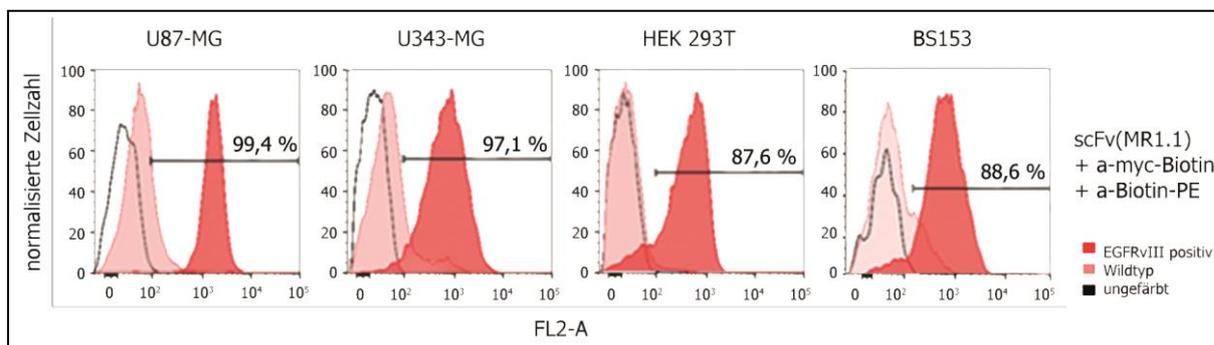


Abbildung 14 Oberflächenexpression von EGFRvIII auf eingesetzten Tumorzelllinien.

Durchflusszytometrische Analysen wurden durchgeführt, um die Oberflächenexpression von EGFRvIII auf den eingesetzten Tumorzelllinien zu überprüfen. Hierfür wurden 5 µg des scFv(MR1.1) sowie anti-myc-Biotin- und anti-Biotin-PE Antikörper (1:15 verdünnt) eingesetzt.

Alle Tumorzelllinien exprimierten nach Selektion den EGFRvIII zu mehr als 85 % auf der Oberfläche, so dass der Rezeptor frei zugänglich für eine spezifische Färbung mit scFv(MR1.1) war. Die unspezifische Färbung bei den Wildtyp-Zellen wurde als Hintergrund definiert und die Fluoreszenzintensität der modifizierten Zellen darauf bezogen. Diese waren im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen deutlich EGFRvIII-positiv. Bemerkenswert war, dass parentale BS153 und auch U343-MG eine leichte Oberflächenfärbung mit dem scFv(MR1.1) zeigten, die sich mit der Färbung der EGFRvIII-positiven Zellen überschneidet. Mit dieser Analyse war der Nachweis erbracht, dass das Antigen für den gegen EGFRvIII gerichteten chimären Antigenrezeptor auf der Oberfläche der modifizierten Tumorzelllinien exprimiert wurde.

3.3.2 Nachweis der Sekretion von SDF-1 α

Zusätzlich zur Oberflächenexpression von EGFRvIII sollten die Zielzellen das Chemokin SDF-1 α ins Medium sekretieren. Es wurde für diese Versuche die U87-MG-Zelllinie gewählt, da sie in späteren Tierversuchen eingesetzt werden sollte. U87-MG^{EGFRvIII} wurden mit lentiviralen Viruspartikeln transduziert (siehe Kapitel 2.5.4.1), welche die genetische Information für das Expressionsplasmid SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR trugen, und anschließend mit Zeocin selektioniert. Als Kontrolle wurden U87-MG^{EGFRvIII} mit pHATrick-EGFP transduziert. Die Zellkulturüberstände (ZKÜ) einer definierten Zellzahl wurden nach 24 h gesammelt und die Konzentration des sekretierten SDF-1 α mittels eines ELISA (siehe Kapitel 2.3.8) bestimmt. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, die Messwerte gemittelt und die Standardabweichung („standard deviation“, S.D.) berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 38 aufgelistet.

Tabelle 38 SDF-1 α -Sekretion von mit p6NST50-SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR transduzierten Gliomzellen

Zelllinie	MW [pg / ml]	S.D.
U87-MG ^{EGFRvIII} / EGFP	0	0
U87-MG ^{EGFRvIII} / SDF-1 α	2.008	228,15

Die Analyse der SDF-1 α -Chemokinkonzentration belegte, dass nur die SDF-1 α exprimierenden Zellen sehr große Mengen des Chemokins in den Zellkulturüberstand sekretierten und so befähigt sein müssten, Zellen mit CXCR4-Chemokinrezeptor anzulocken.

3.3.3 Klonales Überleben *in vitro*

Um zu überprüfen, ob die gentechnischen Veränderungen die Vitalität der Zielzellen verändern, wurde das klonale Überleben von frisch transduzierten und selektionierten U87-MG^{EGFRvIII}, U87-MG^{EGFRvIII} / EGFP, U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α bzw. U87-MG Wildtypzellen *in vitro* überprüft. Pro Gruppe wurden jeweils dreimal 1.000 Zellen in 10 cm Schalen ausplattiert und für 14 Tage im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurden die gewachsenen Klone mit Ethanol fixiert, mit Giemsa gefärbt und makroskopisch ausgezählt (siehe Kapitel 2.5.6). Der Versuch wurde dreimal wiederholt, die Mittelwerte, Standardabweichungen sowie die statistische Signifikanz der Unterschiede mittels Student's t-Test berechnet. Abbildung 15 zeigt das Ergebnis.

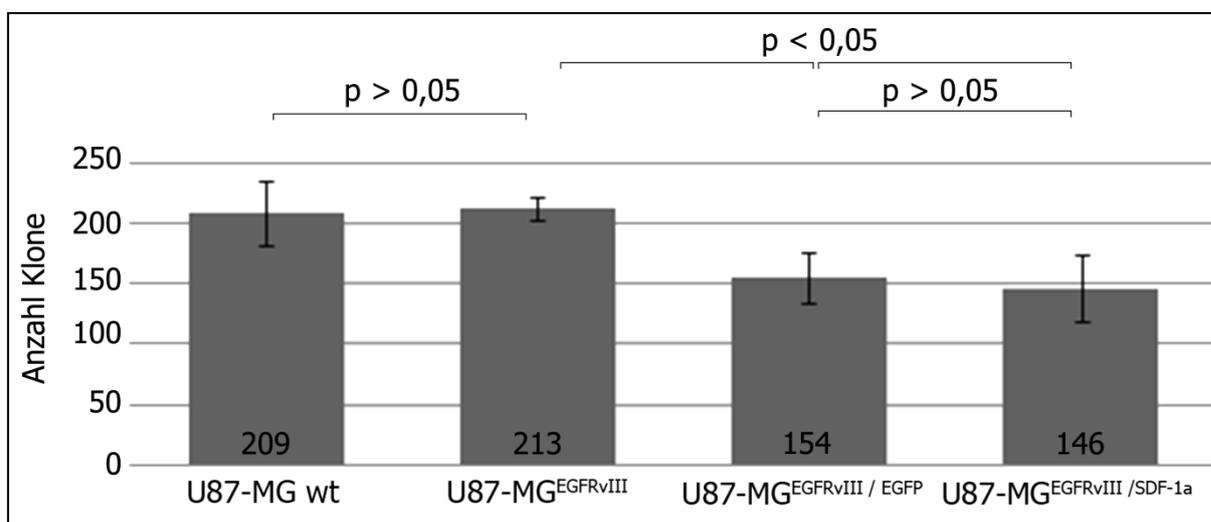


Abbildung 15 Klonales Überleben verschiedener U87-MG-Zielzellen. Nach 14 Tagen Kultivierung wurden die gebildeten Zellkolonien von je 1.000 in 10 cm Schalen ausplattierten Zellen mit Giemsa gefärbt und ausgezählt, um deren Wachstum und Überleben zu vergleichen. Pro Gruppe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt, daraus die Mittelwerte und Standardabweichungen sowie die statistische Signifikanz der Unterschiede bestimmt.

Alle ausplattierten Zellen bildeten Klone. U87-MG Wildtyp und U87-MG^{EGFRvIII} wuchsen jedoch etwas besser als die doppelt transduzierten U87-MG^{EGFRvIII} / EGFP bzw. U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α . Diese zeigten im Vergleich zu Wildtyp und einfach transduzierten

Zellen ein signifikant beeinträchtigt klonales Überleben. Auf Grundlage dieser Ergebnisse *in vitro* wurden in weiterführenden *in vivo* Versuchen mit U87-MG stets 50 % mehr der doppelt transduzierten Zielzellen als der einfach transduzierten Zielzellen eingesetzt, um ein vergleichbares Tumorzellwachstum zu erreichen.

3.3.4 Tumorzell-Passagierung *in vivo* und Persistenz der EGFRvIII-Expression sowie SDF-1 α -Sekretion

Um zu zeigen, dass die derart transduzierten Zielzellen auch *in vivo* überleben und zur Tumorbildung befähigt sind, ohne ihre neuen Eigenschaften (EGFRvIII-Expression, SDF-1 α -Sekretion) zu verlieren, wurden $1,5 \times 10^6$ U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α subkutan in einer kleinen Gruppe NMRI_{NuNu}-Mäuse (n = 4) passagiert (siehe Kapitel 2.6). Nach 21 Tagen wurden die Mäuse in steriler Umgebung getötet, die Tumore entnommen, zerkleinert und das Homogenat in Zellkulturflaschen überführt. Schon nach ein bis zwei Tagen wanderten Tumorzellen aus den Gewebeklumpchen aus. Regelmäßige Medienwechsel wurden durchgeführt, um Gewebetrümmern zu entfernen, so lange, bis nur adhärenente Zellen in den Flaschen übrig blieben. Von Tumoren aus zwei Mäusen wurden auf diese Weise genug Zellen rekultiviert, um sie per Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.5.5) und ELISA (siehe Kapitel 2.3.8) auf ihre Eigenschaften untersuchen zu können. Die Ergebnisse für Maus 1 und Maus 3 sind in Abbildung 16 und Tabelle 39 dargestellt.

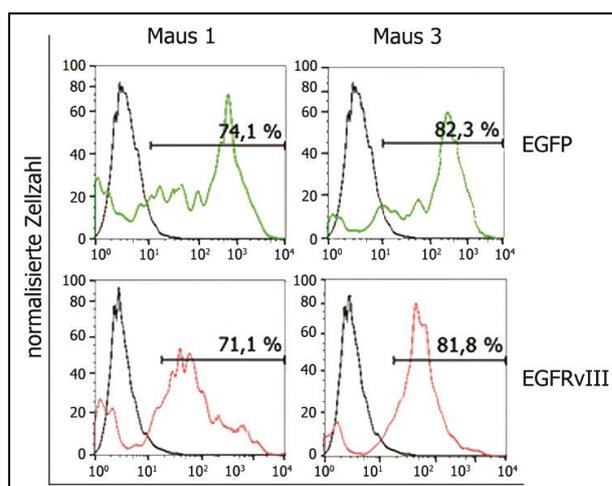


Tabelle 39 SDF-1 α -Sekretion von U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α nach 21 Tagen in der Maus

Zelllinie	MW [pg / ml]	S.D.
U87-MG ^{EGFRvIII} / SDF-1 α <i>in vitro</i>	2.008	228,15
U87-MG ^{EGFRvIII} / SDF-1 α <i>aus der Maus</i>	1.155	292,27

Abbildung 16 Durchflusszytometrische Analyse U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α nach 21 Tagen in der Maus.

Nach *in vivo* Passagierung wurden die Zellen *in vitro* rekultiviert und auf ihre EGFP-Expression und die Oberflächenexpression von EGFRvIII untersucht. Hierfür wurden 5 μ g des scFv(MR1.1) sowie anti-myc-Biotin- und anti-Biotin-PE Antikörper (1:15 verdünnt) eingesetzt.

Auch nach 21 Tagen in der Maus und erneuter Kultivierung *in vitro* behielten die gentechnisch veränderten U87-MG-Gliomzellen ihre Eigenschaften. Durchschnittlich 78,2 % der Zellen waren EGFP-positiv. Wurde das Analysefenster auf die EGFP-positiven Zellen gelegt, gelang der Nachweis von EGFRvIII auf durchschnittlich 76,5 % dieser Zellen. Mit dieser Vorgehensweise wurde ausgeschlossen, dass Bindegewebe oder Hautzellen der

Mäuse statt der eingebrachten Tumorzellen analysiert wurden. Zudem konnte im ELISA gezeigt werden, dass die Zellen noch immer 1.155 (+/- 292,27) pg / ml SDF-1 α in den Zellkulturüberstand sekretierten. Mit diesem Experiment wurde gezeigt, dass das Tumormodell auch in der Maus dazu befähigt ist, CXCR4-positive, CAR-armierte Effektorzellen anzulocken und ihnen das aktivierende Antigen zu präsentieren.

3.4 HERSTELLUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER YTS- UND NK-EFFEKTORZELLEN MIT CHIMÄREN ANTIGENREZEPTOREN UND EXPRESSION DES CXCR4-CHEMOKINREZEPTORS

3.4.1 YTS-Zellen

YTS-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit zum einen mit dem chimären Antigenrezeptor Ig κ _MR1.1_DAP12 sowie den Kontrollkonstrukten Ig κ _DAP12 und Ig κ _MR1.1_DAP12^{mut}, zum anderen mit dem CXCR4-Chemokinrezeptor armiert. Um YTS mit den chimären Rezeptorkonstrukten auszustatten, wurden lentivirale Viruspartikel in HEK 293T produziert (siehe Kapitel 2.5.3), YTS-Zellen mit den Virusüberständen transduziert und diese mit 15 μ g / ml Puromycin für 24 h bzw. mit 150 μ g / ml Hygromycin für 10 Tage selektioniert (siehe Kapitel 2.5.4.1). Hygromycin B ist ein Aminoglykosid und hemmt ebenso wie Puromycin die Proteinsynthese von Eukaryoten und Prokaryoten (*Gritz1983*). Es muss jedoch für eine erfolgreiche Selektion eine höhere Dosis über einen längeren Zeitraum eingesetzt werden. Die Transduktion wurde mittels proteinbiochemischer Methoden sowie Durchflusszytometrie überprüft.

3.4.1.1 Nachweis der korrekten Proteinexpression der eingebrachten Rezeptoren in Zelllysaten

Es wurden YTS wt, YTS CXCR4, YTS DAP12, YTS MR1.1_DAP12^{mut}, YTS MR1.1_DAP12 sowie YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 generiert. Zunächst wurde überprüft, ob YTS-Zellen die eingebrachte Fremd-DNA transkribieren können und die Rezeptorkonstrukte vollständig und unfragmentiert vorliegen. Hierfür wurden 1 x 10⁶ Zellen lysiert (siehe Kapitel 2.4.2), die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt (siehe Kapitel 2.4.3) und eine SDS-Gelelektrophorese mit 50 μ g aufgetragenem Protein durchgeführt. Nach einem Western Blot wurden die Proben mit spezifischen Antikörpern gegen den myc-Tag und gegen DAP12 sowie passenden sekundären HRP-Antikörpern inkubiert (siehe Kapitel 2.4.6). Als Ladekontrolle diente ein Abgleich mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin. Abbildung 17 zeigt die Resultate.

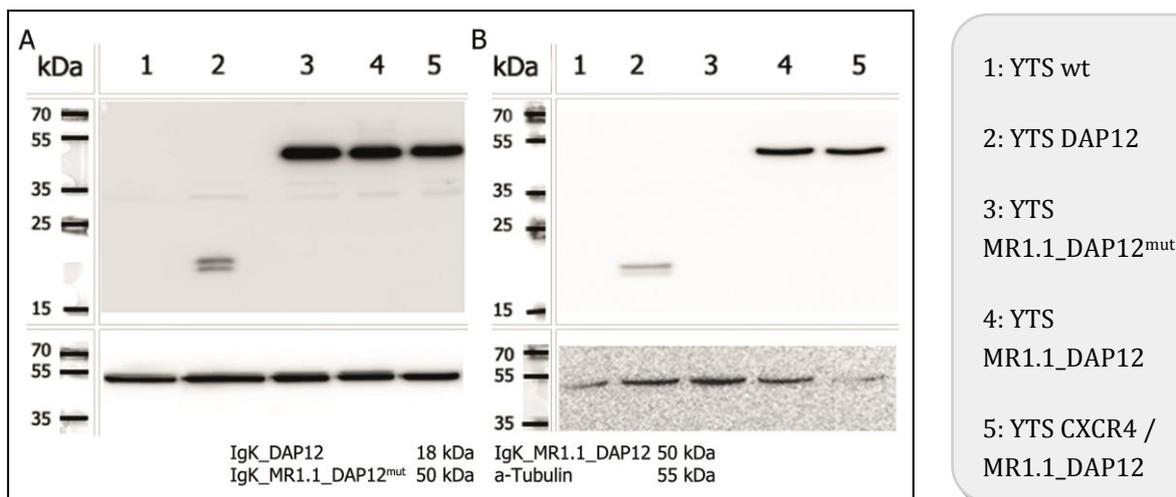


Abbildung 17 Proteinbiochemischer Nachweis chimärer Antigenrezeptoren in YTS. Die Zellysate verschiedener YTS-Effektorzellen wurden durch eine Immunoblot-Analyse auf die korrekte Expression der chimären Antigenrezeptoren überprüft. Hierfür wurden A) ein anti-myc-Antikörper oder B) ein anti-DAP12-Antikörper eingesetzt. Der gleichmäßige Proteinauftrag wurde über den Nachweis von α -Tubulin überprüft.

Die YTS-Zellysate wurden mit zwei Antikörpern auf verschiedenen PVDF-Membranen untersucht. Dafür wurde zum einen ein myc-spezifischer Antikörper (Abbildung 17A), zum anderen ein DAP12-spezifischer Antikörper (Abbildung 17B) verwendet. In Spur 1 wurden jeweils Lysate der YTS-Wildtypzellen aufgetragen, es erfolgte keine spezifische Bindung des Antikörpers. In den Spuren 2 bis 5, in denen Lysate der transduzierten YTS-Zellen aufgetragen wurden, konnten die unterschiedlich großen Rezeptorkonstrukte nachgewiesen werden. Der Ig κ _DAP12 (Spur 2) ist etwa 18 kDa groß, die vollständigen Ig κ _MR1.1_DAP12^{mut} (Spur 3) und Ig κ _MR1.1_DAP12 (Spur 4) sind circa 50 kDa groß. Mit dem monoklonalen DAP12-spezifischen Antikörper konnte der Ig κ _MR1.1_DAP12^{mut} (Spur 3) nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17B). In Spur 5 wurden Lysate von YTS-Zellen aufgetragen, die neben dem Ig κ _MR1.1_DAP12 zusätzlich mit CXCR4 transduziert wurden. Die Proteinkonzentration pro Spur ist laut Tubulinkontrolle vergleichbar, d. h. der Rezeptor ohne Antigenbindestelle (YTS DAP12, Spur 2) wurde etwas schlechter exprimiert als die anderen Rezeptorkonstrukte. Mit diesem Immunoblot wurde gezeigt, dass die in YTS-Zellen eingebrachte Fremd-DNA korrekt abgelesen und mRNA translatiert wird. Die gebildeten Proteine liegen vollständig vor, ohne dass es zu einer Fragmentierung der chimären Antigenrezeptoren kommt. Zudem ist die T2A-Sequenz funktionell und führt zur proteolytischen Abspaltung der durch das PAC-Gen vermittelten Puromycin-Resistenz. Ob die chimären Antigenrezeptoren und der CXCR4-Chemokinrezeptor auch an der Oberfläche der YTS-Effektorzellen exprimiert werden, wurde im folgenden Schritt durchflusszytometrisch untersucht.

3.4.1.2 Nachweis der Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und des Chemokinrezeptors

Die Expression der CAR auf der Oberfläche der YTS-Zellen konnte durchflusszytometrisch über die Detektion des in den CAR vorhandenen c-myc-Epitops mit anti-myc-Biotin und anti-Biotin-PE Antikörpern nachgewiesen werden. Die Expression von CXCR4 wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper, der APC-gekoppelt war, und der entsprechenden Isotypkontrolle überprüft. Jeweils 100.000 Zellen wurden mit den Antikörpern inkubiert und am Durchflusszytometer analysiert (siehe Kapitel 2.5.5). Diese Färbung wurde regelmäßig vor jedem experimentellen Ansatz durchgeführt, um die Effektorzellen zu überprüfen. Abbildung 18 zeigt eine exemplarische Färbung.

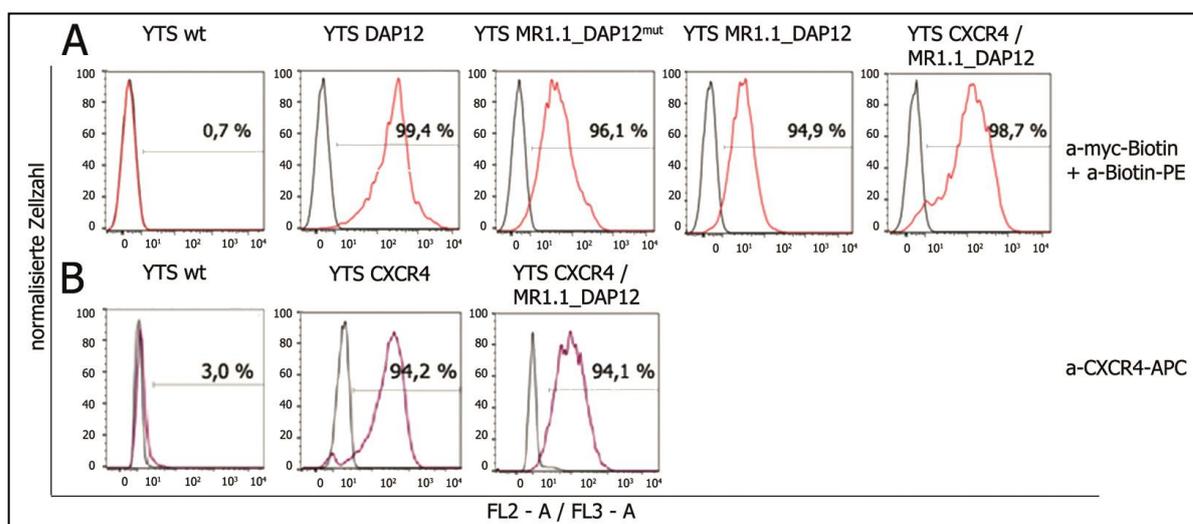


Abbildung 18 Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und CXCR4 auf YTS. Transduzierte YTS-Zellen wurden durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenexpression von A) chimären Antigenrezeptoren mittels anti-myc-Biotin- und anti-Biotin-PE-Antikörpern (1:15 verdünnt), sowie B) auf die Oberflächenexpression von Chemokinrezeptor mittels eines CXCR4-spezifischen Antikörpers (unverdünnt) untersucht.

Alle YTS-Effektorzellen exprimierten nach Selektion den jeweiligen chimären Antigenrezeptor bzw. den Chemokinrezeptor CXCR4 zu mehr als 90 % auf der Oberfläche, so dass diese für eine Antikörperfärbung frei zugänglich waren. Wildtypzellen wurden nicht unspezifisch angefärbt.

3.4.2 Primäre humane NK-Zellen

Primäre humane NK-Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit von drei verschiedenen gesunden Spendern isoliert und *in vitro* expandiert sowie aktiviert (siehe Kapitel 2.5.1.2). Dann wurden die NK-Effektorzellen zum einen mit dem chimären Antigenrezeptor Ig κ _MR1.1_DAP12 und dem Kontrollkonstrukt Ig κ _DAP12, zum anderen mit dem CXCR4-Chemokinrezeptor armiert. Um primäre humane NK-Zellen mit den chimären Rezeptorkonstrukten auszustatten, wurden lentivirale Viruspartikel in HEK 293T produziert (siehe Kapitel 2.5.3), die NK-Zellen mit den Virusüberständen transduziert und diese mit 10 μ g / ml Puromycin für 6 - 8 h selektioniert (siehe Kapitel 2.5.4.1). Die Transduktionseffizienz wurde mit proteinbiochemischen Methoden sowie Durchflusszytometrie überprüft.

3.4.2.1 Isolation von primären humanen NK-Zellen aus peripherem Blut

Primäre humane NK-Zellen wurden, wie in Kapitel 2.5.1.2 beschrieben, aus dem peripheren Blut von drei gesunden Spendern mit Miltenyi-MACS-Technik isoliert. Je 200.000 Zellen aus dem ersten und zweiten Aufreinigungsschritt wurden mit anti-CD3-FITC sowie anti-CD56-PE gefärbt. In einer durchflusszytometrischen Messung wurde im Forward-Sideward-Scatter ein Analysefenster für die Lymphozytenpopulation ausgewählt und die Oberflächenexpression von FITC-markiertem CD3 als T-Zell-Marker und PE-markiertem CD56 als NK-Zell-Marker in der Population untersucht (siehe Kapitel 2.5.5.1). Abbildung 19 zeigt die Ergebnisse an einem exemplarischen Beispiel.

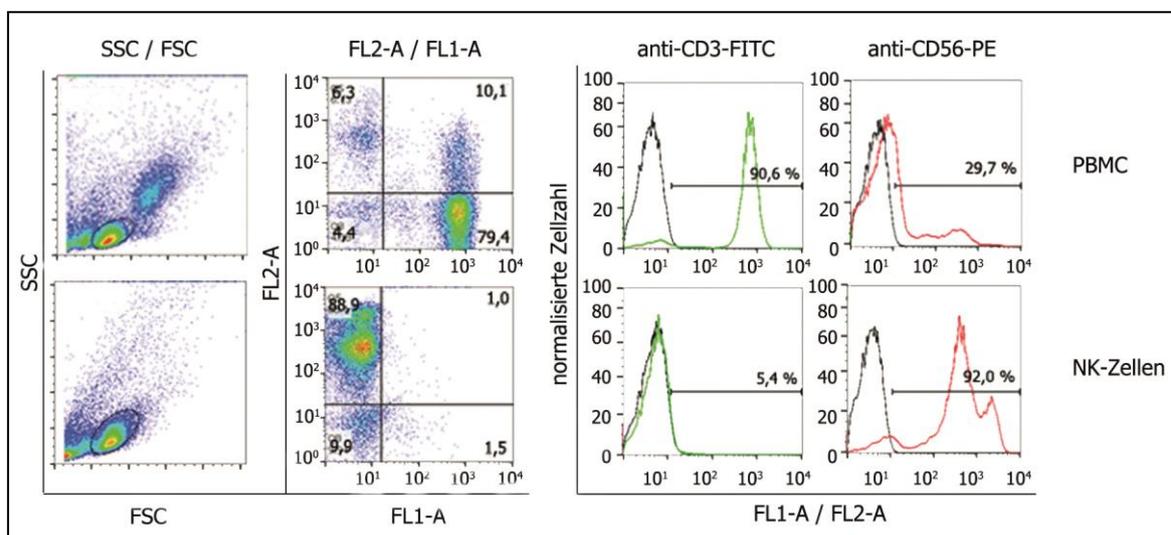


Abbildung 19 Beispiel für Isolation und Aufreinigung von NK-Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von Spender 1. Eine durchflusszytometrische Analyse und Färbung mit anti-CD3-FITC sowie anti-CD56-PE Antikörpern identifizierte T-Zellen und NK-Zellen in den beiden Aufreinigungsstufen der NK-Zell-Isolation.

Zunächst wurden die durch Ficoll-Gradientenzentrifugation gewonnenen PBMC untersucht. Bei der Analyse mit FlowJo wurde im Forward-Sideward-Scatter deren Heterogenität deutlich. Ein Analysefenster wurde auf die Lymphozytenpopulation gelegt, dann die emittierte Fluoreszenz im FL-1 und FL-2-Kanal untersucht. Circa 90 % der Lymphozyten in PBMC waren CD3-positiv T-Zellen. Nur knapp jede zehnte Zelle trug ausschließlich CD56 und wurde somit als NK-Zelle identifiziert. Eine Population von 10 % trug sowohl CD3 als auch CD56, wie es für NKT-Zellen typisch ist. Nach Aufreinigung mit dem „MACS NK isolation and expansion“ Kit (Miltenyi) blieb im Forward-Sideward-Scatter nur die Lymphozytenpopulation übrig, andere Zelltypen wurden entfernt. In der Fluoreszenzanalyse wurde sichtbar, dass nach Aufreinigung die Lymphozyten fast vollständig T-Zell-depletiert waren. Nur noch 5 % der Zellen trugen CD3. Dafür war die isolierte NK-Zell-Population sehr rein und zu 92 % CD56-positiv. Die NK-Zellen wurden in CellGro-Medium (komplett) in Kultur genommen, mit dem „NK Cell Activation / Expansion Kit“ (Miltenyi) inkubiert und nach Expansion und Aktivierung mit viralen Zellkulturüberständen transduziert, die für die Expressionsplasmide der CAR oder des CXCR4-Rezeptors kodierten.

3.4.2.2 Nachweis der Proteinexpression der eingebrachten Rezeptoren in Zelllysaten

Es wurden neben Wildtyp-NK-Zellen die Effektorzellen NK DAP12 und NK MR1.1_DAP12 generiert. Auf eine Transduktion mit Igκ_MR1.1_DAP12^{mut} wurde verzichtet, da dieser Kontrollvektor schon in YTS-Zellen überprüft wurde und zudem nach der Isolation von NK-Zellen nur begrenzte Zellzahlen für Versuche zur Verfügung standen. Zunächst wurde untersucht, ob primäre humane NK-Zellen die eingebrachte Fremd-DNA transkribieren können und ob die gebildeten Proteine in den NK-Zellen vollständig vorliegen. Hierfür wurden 1×10^6 Zellen lysiert (siehe Kapitel 2.4.2), die Proteinkonzentration im Lysat bestimmt (siehe Kapitel 2.4.3) und eine SDS-Gelelektrophorese mit 50 µg aufgetragenem Protein durchgeführt. Nach einem Western Blot wurden die Proben mit spezifischen Antikörpern gegen den myc-Tag und gegen DAP12 sowie passenden sekundären HRP-Antikörpern inkubiert (siehe Kapitel 2.4.6). Als Ladekontrolle diente ein Abgleich mit einem spezifischen Antikörper gegen α -Tubulin. Abbildung 20 zeigt die Resultate.

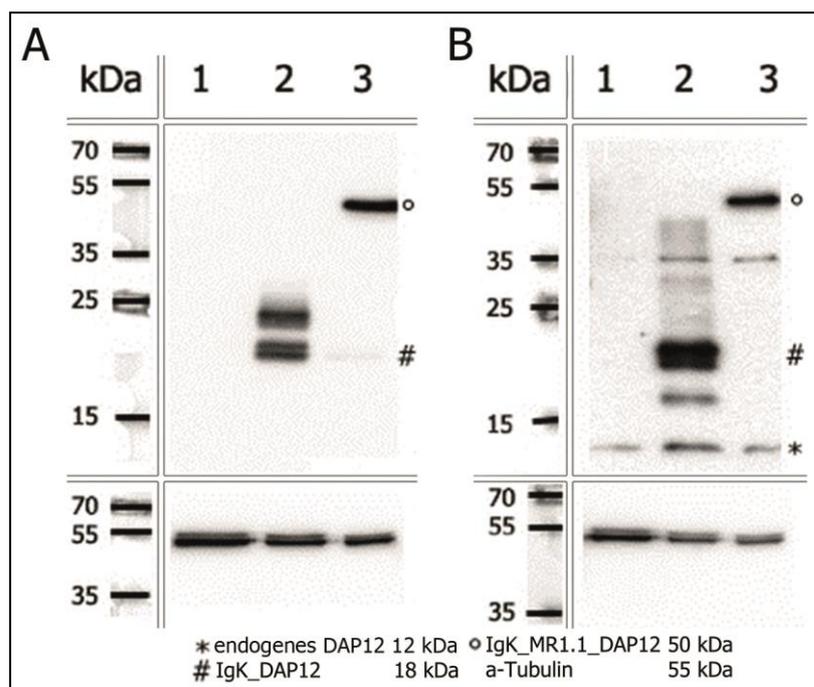


Abbildung 20 Proteinbiochemischer Nachweis chimärer Antigenrezeptoren in NK-Zellen.

Die Zelllysate verschiedener NK-Effektorzellen wurden durch eine Immunoblot-Analyse auf die korrekte und unfragmentierte Expression der chimären Antigenrezeptoren überprüft. Hierfür wurden A) ein anti-myc-Antikörper oder B) ein anti-DAP12-Antikörper eingesetzt. Der gleichmäßige Proteinauftrag wurde über einen anti- α -Tubulin-Antikörper nachgewiesen.

Die NK-Zelllysate wurden mit zwei Antikörpern auf verschiedenen PVDF-Membranen untersucht. Dafür wurde zum einen ein myc-spezifischer Antikörper (Abbildung 20A), zum anderen ein DAP12-spezifischer Antikörper (Abbildung 20B) verwendet. In Spur 1 wurden jeweils Lysate der NK-Wildtypzellen aufgetragen, es erfolgte keine spezifische Bindung der Antikörper. In den Spuren 2 und 3, in denen Lysate der transduzierten NK-Zellen aufgetragen wurden, konnten die unterschiedlich großen Rezeptorkonstrukte nachgewiesen werden. Der Ig κ _DAP12 (#) (Spur 2) ist circa 18 kDa groß, der Ig κ _MR1.1_DAP12 (°) (Spur 3) etwa 50 kDa. Im Blot ist sichtbar, dass der CAR unfragmentiert und vollständig exprimiert wird. Interessanterweise gelang bei NK-Zellen mit dem DAP12-spezifischen Antikörper auch der Nachweis von endogenem DAP12 (*), welches als schwache Bande auf Höhe von circa 12 kDa läuft. Die bei knapp 25 kDa laufende Bande in Spur 2 der Abbildung 20A könnte eventuell posttranslational verändertetes Ig κ _DAP12 repräsentieren. In Abbildung 20B sind ebenfalls einige zusätzliche Banden zu erkennen, wobei die auf circa 16 kDa laufende Bande in Spur 2 eventuell phosphoryliertes endogenes DAP12 darstellen könnte, während die bei 35 kDa laufende Bande unerklärlich bleibt und auf einer unspezifischen Bindung des anti-DAP12-Antikörpers beruhen muss. Die Beladung der Membranen erfolgte gleichmäßig, wie die in allen Spuren etwa gleich starke α -Tubulin-spezifische Bande (circa 55 kDa) zeigt. Ob die chimären Antigenrezeptoren und der CXCR4-Chemokinrezeptor auch an der Oberfläche der NK-Effektorzellen exprimiert werden, wurde im folgenden Schritt untersucht.

3.4.2.3 Nachweis der Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und Chemokinrezeptoren

Die Transduktion primärer Zellen stellt häufig eine Herausforderung dar. Zur Transduktion der NK-Zellen wurde daher statt der üblicherweise in unserem Labor genutzten Methode ein modifiziertes Protokoll nach Sutlu et al. (*Sutlu2012*) verwendet (siehe Kapitel 2.5.4.2). Beide Methoden wurden zunächst parallel durchgeführt, um die damit erreichbare Oberflächenexpression der verschiedenen chimären Antigenrezeptoren auf primären humanen NK-Zellen vergleichen zu können. Zur Überprüfung der Transduktionseffizienzen wurden jeweils 100.000 Zellen mit anti-myc-Biotin und anti-Biotin-PE Antikörpern oder mit einem anti-CXCR4-APC-Antikörper samt Isotypkontrolle gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe Kapitel 2.5.5). Tabelle 40 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse.

Tabelle 40 Vergleich Transduktionseffizienzen von primären humanen NK-Zellen

		CXCR4	DAP12	MR1.1_DAP12	CXCR4 / MR1.1_DAP12
übliches Protokoll	Anzahl Experimente	12	7	7	
	MW	52,0 %	32,5 %	7,0 %	
	minimal	14,0 %	11,4 %	1,3 %	
	maximal	90,0 %	57,6 %	17,5 %	
Protokoll nach Sutlu et al.	Anzahl Experimente	11	12	12	4
	MW	82,5 %	89,2 %	56,0 %	20,2 %
	minimal	28,7 %	74,2 %	36,2 %	12,4 %
	maximal	99,7 %	98,8 %	97,5 %	30,9 %

Der Vergleich der beiden Transduktionsprotokolle zeigt deutlich, dass mit dem modifizierten Protokoll nach Sutlu et al. wesentlich bessere Transduktionseffizienzen und Oberflächenexpressionen der chimären Antigenrezeptoren und des CXCR4-Chemokinrezeptors erzeugt werden konnten als mit dem sonst üblichen Transduktionsprotokoll. Die kürzeren Rezeptorkonstrukte CXCR4 und Igκ_DAP12 waren mit dem alten Protokoll zwar durchschnittlich zu 52,0 % bzw. 32,5 % auf der Oberfläche der Zellen nachweisbar, der über 8.000 bp große Igκ_MR1.1_DAP12 wurde jedoch nur zu 7,0 % exprimiert. Mit dem neuen Protokoll gelang es, die Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren auf NK-Zellen wesentlich zu verbessern. Für CXCR4 wurde eine durchschnittliche Expression von 82,5 % erreicht, Igκ_DAP12 wurde durchschnittlich zu 89,2 % exprimiert. Auch der Igκ_MR1.1_DAP12 wurde nach Transduktion mit dem neuen Protokoll zu 56,0 % exprimiert. Der Versuch, primäre humane NK-Zellen doppelt mit CXCR4 und Igκ_MR1.1_DAP12 zu transduzieren, gelang jedoch nicht in zufriedenstellendem Maße. Hierbei wurde zwar der Chemokinrezeptor sehr gut exprimiert, doch der CAR gelangte nur zu durchschnittlich 20,2 % auf die Oberfläche der Zellen. Eine doppelte Transduktion von primären humanen NK-Zellen war daher nicht realisierbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die NK-Zell-Experimente in den weiteren Kapiteln mit primären NK-Zellen durchgeführt, die laut dem abgeänderten SUTLU-Protokoll transduziert wurden. Abbildung zeigt eine exemplarische Färbung, wie sie den in Tabelle 40 gezeigten Daten zugrunde liegt.

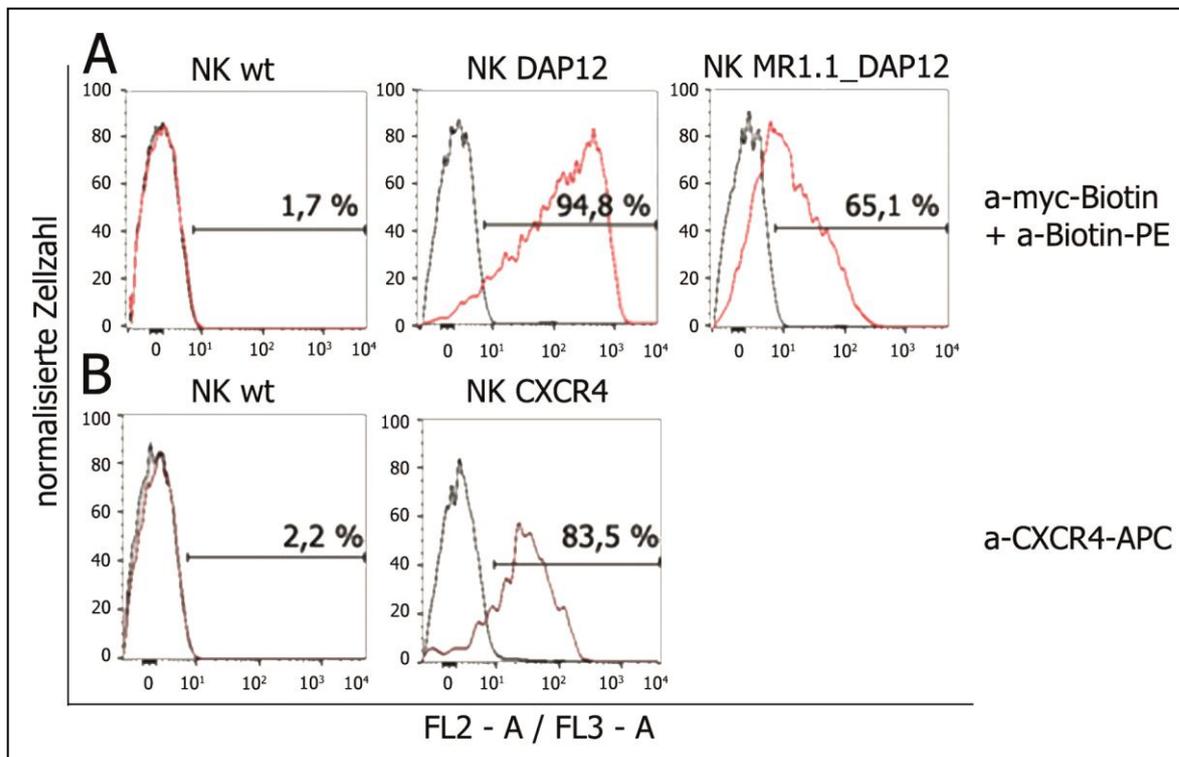


Abbildung 21 Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und CXCR4 auf primären humanen NK-Zellen von Spender 1 mit Transduktionsprotokoll nach SUTLU et al. Primäre humane NK-Zellen wurden 7 Tage nach Transduktion laut abgeändertem SUTLU-Protokoll durchflusszytometrisch auf ihre Oberflächenexpression von A) chimären Antigenrezeptoren mittels anti-myc-Biotin- und anti-Biotin-PE-Antikörpern (1:15 verdünnt), sowie B) auf die Oberflächenexpression des Chemokinrezeptors mittels eines anti-CXCR4-APC-Antikörpers (unverdünnt) untersucht.

Die Experimente erbrachten den Nachweis, dass sowohl die NK-Zelllinie YTS als auch primäre humane NK-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren und dem CXCR4-Chemokinrezeptor transduziert werden können und dass diese Rezeptoren auf der Zellmembran exprimiert werden. Folgerichtig wurde als nächstes überprüft, ob die Rezeptoren in den Effektorzellen auch funktionell sind.

3.5 FUNKTIONALITÄT DER EFFEKTORZELLEN *IN VITRO*

Dieses Kapitel fasst die Experimente zusammen, in denen untersucht wurde, ob zum einen das von den modifizierten Tumorzelllinien sekretierte SDF-1 α die gentechnisch veränderten Effektorzellen chemotaktisch anlocken kann und zum anderen, ob die Expression des EGFRvIII ausreicht, ein zytotoxisches Signal in den CAR-exprimierenden Effektorzellen zu induzieren. Die Experimente mit YTS-Zellen wurden hierfür mindestens dreimal durch-

geführt und die Ergebnisse gemittelt. Aufgrund der bei jedem Experiment schwankenden Transduktionseffizienz bei NK-Zellen (siehe Kapitel 3.4.2.3) wird, sofern nicht anders angegeben, für diese jeweils nur ein repräsentatives Experiment gezeigt, aber auch NK-Zell-Experimente wurden mindestens zweimal durchgeführt.

3.5.1 Migratorisches Potential

3.5.1.1 YTS-Zellen

Der Migrationsassay zum Nachweis der gerichteten Chemotaxis wurde in Boyden-Kammern durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.7). Jeweils 50.000 YTS wt bzw. CXCR4-modifizierte YTS und Zellkulturüberstände von U87-MG^{EGFRvIII} / EGFP oder U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α bzw. FKS-freies Medium wurden eingesetzt. Die Boyden-Kammer wurde für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Zahl der durch die 8 μ m großen Poren der Membran gewanderten Effektorzellen im unteren Well per Neubauer-Kammer-Zählung bestimmt. Der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Mittelwerte der Zellzahlen sowie die Standardabweichungen („standard deviation“, S.D.) wurden aus den drei Experimenten berechnet und die statistische Signifikanz der Unterschiede durch den Student's t-Test ermittelt. Zudem wurde in einem der drei Versuche der CXCR4-Inhibitor AMD3100 mitgeführt, um die Abhängigkeit der Migration von der SDF-1 α / CXCR4-Achse zu zeigen. Abbildung 22 zeigt die Ergebnisse.

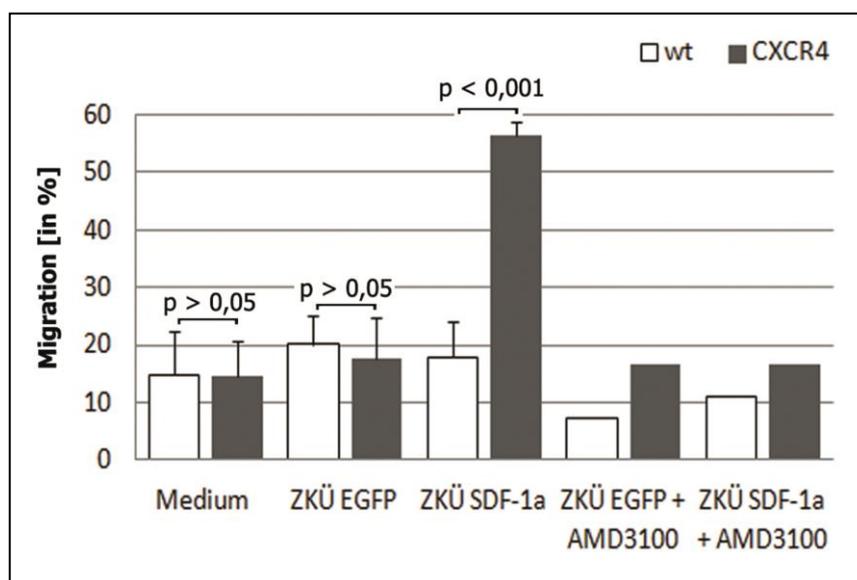


Abbildung 22 *in vitro* Migration von YTS im Boyden-Kammer-Assay. YTS wt und YTS CXCR4 wurden auf ihr Migrationsverhalten entlang eines SDF-1 α -Chemokingradienten untersucht. In einer Boyden-Kammer mit 8 μ m Porengröße wurde ausgezählt, wie viele Zellen durch die Membran hindurch zu FKS-freiem Medium, Zellkulturüberstand von U87-MG^{EGFRvIII} / EGFP oder Zellkulturüberstand von U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α in das untere Well einwanderten. Die Abhängigkeit von CXCR4 wurde durch den Einsatz des CXCR4-inhibierenden Moleküls AMD3100 überprüft. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Es wurde deutlich, dass FKS-freies Medium allein kein chemoattraktives Potential für YTS-Zellen besitzt. Auch der Zellkulturüberstand von mit EGFP transduzierten Kontrollzellen hatte nicht den Effekt, dass YTS-Zellen ins untere Well der Boyden-Kammer migrierten. SDF-1 α -haltiger Zellkulturüberstand führte jedoch dazu, dass 55 % der CXCR4-positiven YTS durch die Membran wanderten, während YTS Wildtypzellen dies nicht verstärkt taten. Dieser Unterschied war statistisch sehr signifikant. Dass die Wanderung tatsächlich CXCR4-abhängig ist, wurde durch den Einsatz des inhibierenden Moleküls AMD3100 bewiesen, welches die Migration der CXCR4-positiven YTS unterband und auf das Niveau der Medium- bzw. EGFP-Kontrolle senkte.

3.5.1.2 Primäre humane NK-Zellen

Der Migrationsassay zum Nachweis der gerichteten Chemotaxis von NK-Zellen wurde in Boyden-Kammern mit dem gleichen Versuchsaufbau wie für YTS-Zellen durchgeführt (siehe Kapitel 2.5.7). Die NK-Zellen waren zum Zeitpunkt des Versuchs seit 14 Tagen in Kultur. Die CXCR4-Expression der transduzierten NK-Zellen lag, wie in Kapitel 3.4.2.3 gezeigt, meist bei etwa 80 %. Die Boyden-Kammer wurde für 3 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend die Zahl der durch die 3 μ m großen Poren der Membran gewanderten NK-Zellen im unteren Well per Neubauer-Kammer-Zählung bestimmt. Der Versuch wurde mit NK-Zellen von zwei verschiedenen Spendern als Doppelbestimmung durchgeführt und dreimal wiederholt. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde durch den Student's t-Test ermittelt. Zudem wurde in einem der drei Versuche der CXCR4-Inhibitor AMD3100 mitgeführt, um die Abhängigkeit der Migration von der SDF-1 α / CXCR4-Achse zu zeigen. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse.

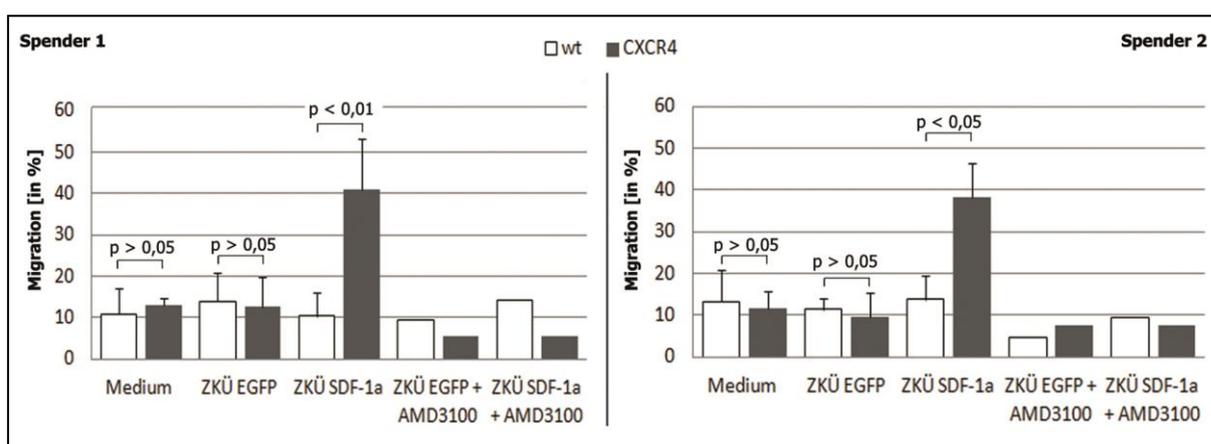


Abbildung 23 *in vitro* Migration NK-Zellen im Boyden-Kammer-Assay. NK wt und NK CXCR4 von zwei Spendern wurden auf ihr Migrationsverhalten entlang eines SDF-1 α -Chemokingradienten untersucht. In einer Boyden-Kammer mit 3 μ m Porengröße wurde ausgezählt, wie viele Zellen durch die Membran hindurch zu FKS-freiem Medium, Zellkulturüberstand von U87-MG^{EGFRvIII} / EGFP oder Zellkulturüberstand von U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α in das untere Well einwanderten. Die Abhängigkeit von CXCR4 wurde durch den Einsatz des CXCR4-inhibierenden Moleküls AMD3100 überprüft. Die Abbildung zeigt Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Auch primäre humane NK-Zellen, die den Chemokinrezeptor CXCR4 exprimierten, waren in der Lage, entlang eines chemotaktischen SDF-1 α -Gradienten in das untere Well einer Boyden-Kammer zu migrieren. Weder FKS-freies Medium noch der Zellkulturüberstand von mit EGFP transduzierten Kontrollzellen besaßen chemoattraktives Potential für die NK-Zellen. SDF-1 α -haltiger Zellkulturüberstand führte dazu, dass bis zu 41 % der CXCR4-positiven NK-Zellen von Spender 1 und bis zu 39 % der CXCR4-positiven NK-Zellen von Spender 2 durch die Poren der Membran wanderten, während NK-Wildtypzellen dies nicht verstärkt taten. Dieser Unterschied war für beide Spender statistisch signifikant. Dass die Wanderung tatsächlich CXCR4-abhängig ist, wurde durch den Einsatz des inhibierenden Moleküls AMD3100 bewiesen, welches die Migration der CXCR4-positiven NK-Zellen unterband und auf das Niveau der Medium- bzw. EGFP-Kontrolle senkte. Diese Experimente zeigen, dass sowohl CXCR4-positive YTS-Zellen als auch primäre humane NK-Zellen in der Lage sind, über den Chemokinrezeptor SDF-1 α zu erkennen und entlang eines entsprechenden chemotaktischen Gradienten zu migrieren.

3.5.2 Zytotoxisches Potential

3.5.2.1 Aktivierung der zytotoxischen Signalkaskade in CAR-modifizierten YTS-Zellen durch Phosphorylierung von ZAP70

Um die spezifische und rezeptorvermittelte Aktivierung der Signalwege in den YTS-Zellen nachzuweisen, wurde eine 4-stündige Kokultivierung der CAR-armierten YTS-Effektorzellen mit HEK 293T Wildtypzellen und HEK 293T^{EGFRvIII} durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und phosphoryliertes ZAP70 durch Inkubation mit einem phosphoZAP70-spezifischen Antikörper und passendem sekundären HRP-Antikörper nachgewiesen (siehe Kapitel 2.4.6). Als Ladekontrolle diente die Inkubation mit Antikörpern gegen unphosphoryliertes ZAP70 und gegen α -Tubulin. Abbildung 24 zeigt einen repräsentativen Blot und dessen densitometrische Auswertung mittels Image J (NIH, USA). Die Stärke der Proteinbanden wurde in Relation zur Stärke der YTS-Wildtyp-Bande gesetzt und so die Unterschiede zwischen den YTS-Effektorzellen und Kokultivierungen bestimmt.

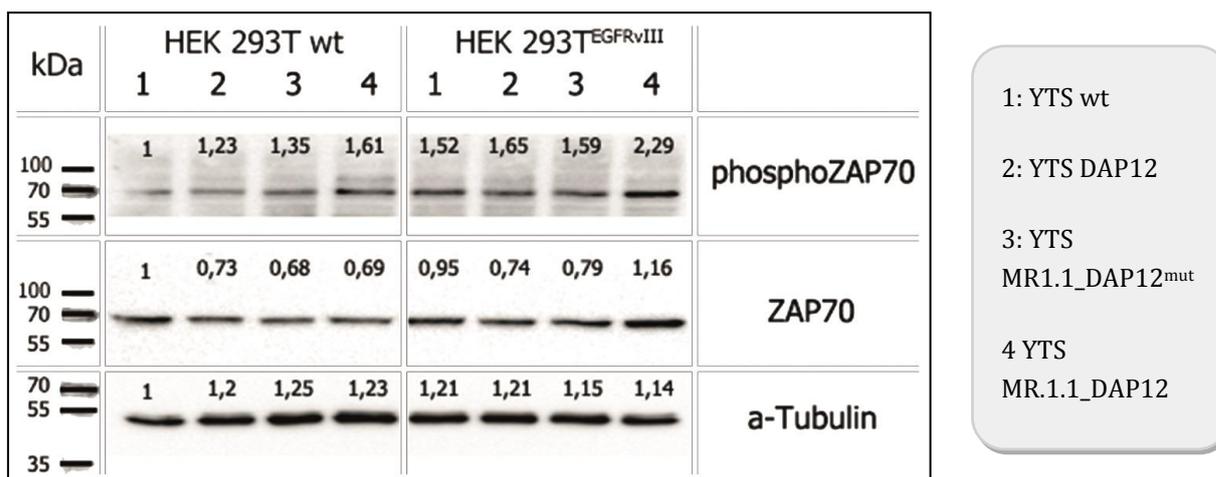


Abbildung 24 *in vitro* Aktivierung der zytotoxischen Signalkaskade in YTS. CAR-armede YTS-Zellen wurden für 4 h mit HEK 293T kokultiviert, die entweder Wildtypzellen waren oder den EGFRvIII als Antigen präsentierten. YTS MR1.1_DAP12 wurden spezifisch durch EGFRvIII aktiviert und die Phosphorylierung von ZAP70 induziert. Der Nachweis in den Zelllysaten erfolgte proteinbiochemisch mittels spezifischer Antikörper und passenden sekundären HRP-Antikörpern. Die Stärke der Banden wurde densitometrisch bestimmt. Der gleichmäßige Proteinauftrag wurde über den Nachweis von α -Tubulin überprüft. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Die Immunoblot-Analyse zeigte, dass die Kokultivierung von YTS DAP12, YTS MR1.1_DAP12^{mut} oder YTS MR1.1_DAP12 mit Wildtyp-Zielzellen zu einem kaum erhöhten Level von phosphoryliertem ZAP70 führte. YTS-Zellen, die den funktionellen CAR Ig κ _MR1.1_DAP12 auf der Oberfläche trugen, wurden jedoch aktiviert, wenn die Zielzellen das EGFRvIII-Antigen präsentierten. Die densitometrische Auswertung ergab einen Anstieg von phosphoryliertem ZAP70 um mehr als das Doppelte im Vergleich zu YTS-Wildtypzellen. Diese Aktivierung war spezifisch, denn die Kokultivierung der mit Kontrollkonstrukten transduzierten YTS-Zellen mit HEK 293T^{EGFRvIII} führte nicht zu einer eindeutig verstärkten Phosphorylierung von ZAP70 und nur zu einem leichten Anstieg der Bandenstärke um etwa die Hälfte. Die ZAP70-Expression in den YTS-Zellen war annähernd gleich, nur die aktivierten YTS MR1.1_DAP12 zeigten eine leichte Überexpression von unphosphoryliertem ZAP70. Die Beladung der PVDF-Membran mit Protein war gleichmäßig, wie die Tubulinkontrolle zeigt.

3.5.2.2 Chromfreisetzung-Assay mit CAR-modifizierten YTS-Zellen

Ob die Induktion der zytotoxischen Signalwege über phosphoryliertes ZAP70 ausreicht, um EGFRvIII-positive Zielzellen durch die mit CAR armierten YTS spezifisch zu lysieren, wurde in einem Chromfreisetzung-Assay untersucht. Verschiedene Zielzellen wurden mit ⁵¹Cr beladen und mit CAR-modifizierten YTS-Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen (Effektor-Target-Ratio) für 21 h kokultiviert (siehe Kapitel 2.5.7.4). Zunächst wurde überprüft, ob die Armierung von YTS-Zellen deren Aktivität im Allgemeinen verändert. Hierfür wurden als Zielzellen die HLA-negativen K562 gewählt. Abbildung 25 zeigt hierfür

das Ergebnis, während Abbildung die Daten für verschiedene Tumorzelllinien (Wildtyp und EGFRvIII-positiv) zeigt. Die Versuche wurden für alle Zelllinien als Triplet durchgeföhrt und dreimal wiederholt. Die Mittelwerte der Messungen, die Standardabweichung („standard deviation“, S.D.) sowie die statistische Signifikanz laut Student’s t-Test wurden berechnet.

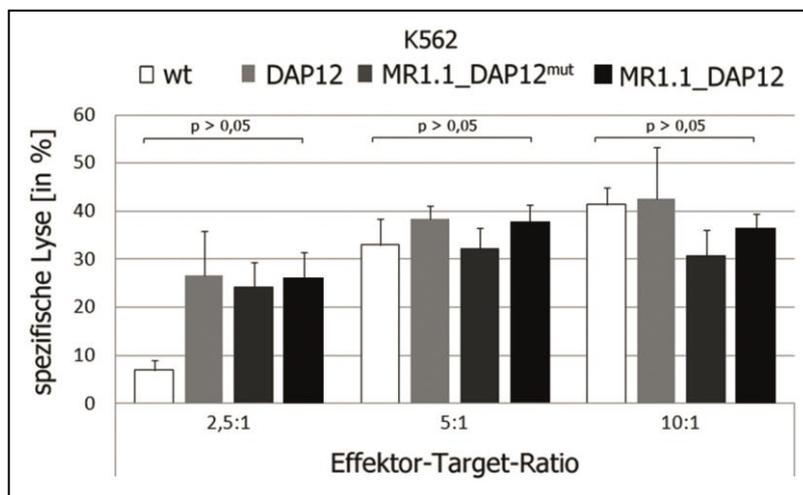


Abbildung 25 *in vitro* Zytotoxizität von CAR-arnierten YTS gegenüber HLA-negativen K562. Wildtyp-YTS und CAR-arnierte YTS wurden im Chromfreisetungs-Assay für 21 h mit K562 kultiviert. Diese Zellen wurden von YTS aufgrund ihrer fehlenden HLA-Expression lysiert. Dabei gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lyseraten von YTS wt und CAR-modifizierten YTS. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Im ersten Chromfreisetungs-Assay wurde deutlich, dass YTS-Effektorzellen HLA-ABC-negative K562 erkennen und lysieren konnten. Auch wenn die Transduktion z. T. zu verringerten Lyseraten führte, waren diese Unterschiede nicht statistisch signifikant. Es wurden, wie in Abbildung 25 erkennbar, bei einer Effektor-Target-Ratio von 10:1 nach 21 h circa 40 % der K562 abgetötet, unabhängig davon ob und mit welchem CAR die YTS-Zellen transduziert worden waren. Also führte die Transduktion an sich nicht zu einer Verschlechterung ihrer inhärenten zytotoxischen Eigenschaften.

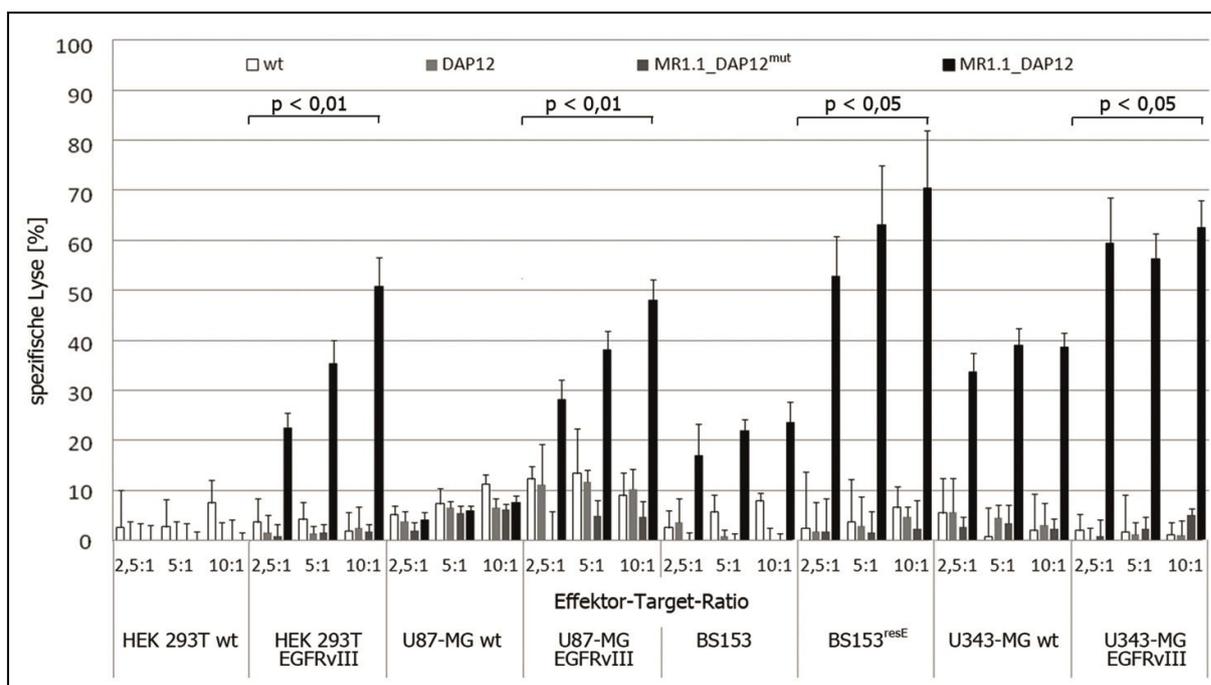


Abbildung 26 *in vitro* Zytotoxizität von CAR-modifizierten YTS gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. Wildtyp-YTS und CAR-armierte YTS wurden im Chromfreisetzung-Assay für 21 h mit verschiedenen Tumorzelllinien kokultiviert, die entweder Wildtypzellen waren oder den EGFRvIII als Antigen präsentierten. EGFRvIII-positive Tumorzellen wurden spezifisch lysiert. Der Unterschied in der spezifischen Lyse von Wildtyp-Zielzellen und EGFRvIII-positiven Zielzellen durch YTS MR1.1_DAP12 war bei einer Effektor-Target-Ratio von 10:1 stets signifikant. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

HEK 293T und U87-MG Wildtypzellen wurden von den CAR-armierten YTS-Effektorzellen nicht lysiert, die maximale Hintergrundlyse betrug weniger als 10 %. Die EGFRvIII-positiven Zielzellen wurden hingegen konzentrationsabhängig und spezifisch lysiert. Abbildung 26 zeigt, dass bei einer Effektor-Target-Ratio von 10:1 nach 21 h etwa 50 % der HEK 293T^{EGFRvIII} und 48 % der U87-MG^{EGFRvIII} von YTS MR1.1_DAP12 lysiert wurden. Bei einer Effektor-Target-Ratio von 10:1 war der Unterschied in der spezifischen Lyse von Wildtyp-Zielzellen und EGFRvIII-positiven Zielzellen durch YTS MR1.1_DAP12 dabei sehr signifikant. Die mit Kontrollkonstrukten transduzierten YTS-Zellen waren nicht in der Lage, Tumorzellen abzutöten.

EGFRvIII-positive U343-MG und BS153^{resE} wurden ebenfalls sehr spezifisch von YTS MR1.1_DAP12 lysiert. Nach 21 h wurden BS153^{resE} bis zu 71 % lysiert, bei U343-MG^{EGFRvIII} wurden Lyseraten von bis zu 70 % erreicht. Jedoch zeigt die Abbildung 26 in allen Wiederholungen auch eine geringe Lyse von Wildtyp-Zielzellen. Diese Lyse betrug bis zu 25 % bei den parental BS153. Diese besitzen, wie in der PCR (siehe Abbildung 12) und in der durchflusszytometrischen Analyse (siehe Abbildung 14) nachgewiesen, eine leichte Expression von EGFRvIII an sich. U343-MG Wildtypzellen wurden bis zu 38 % von YTS MR1.1_DAP12 lysiert, auch wenn für diese Zellen keine eindeutige EGFRvIII-Expression

durch die PCR (siehe Abbildung 12) nachgewiesen werden konnte. Dennoch waren die Unterschiede der Lyseraten von YTS MR1.1_DAP12 gegenüber Wildtyp-Zielzellen und EGFRvIII-positiven Zielzellen bei einer Effektor-Target-Ratio von 10:1 noch signifikant. Die mit Kontrollkonstrukten transduzierten YTS-Zellen waren in keinem Fall in der Lage, parentale BS153 oder U343-MG Wildtypzellen abzutöten.

3.5.2.3 Chromfreisetzung-Assay mit CAR- und Chemokinrezeptor-tragenden YTS-Zellen

Ob die Einzeltransduktion mit dem CXCR4-Chemokinrezeptor oder die Kotransduktion von YTS MR1.1_DAP12 mit dem CXCR4-Chemokinrezeptor zu einer Minimierung ihres zytotoxischen Potentials führt, wurde ebenso in einem Chromfreisetzung-Assay überprüft. Im gleichen Versuchsansatz wie in Kapitel 3.5.2.3 wurden verschiedene Tumorzelllinien (Wildtyp und EGFRvIII-positiv) mit YTS CXCR4, YTS MR1.1_DAP12 und YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 kokultiviert. Die Versuche wurden als Tripletts durchgeführt und dreimal wiederholt. Die Mittelwerte der Messungen und die Standardabweichung („standard deviation“, S.D.) wurden berechnet sowie die statistische Signifikanz mittels Student's t-Test bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 dargestellt.

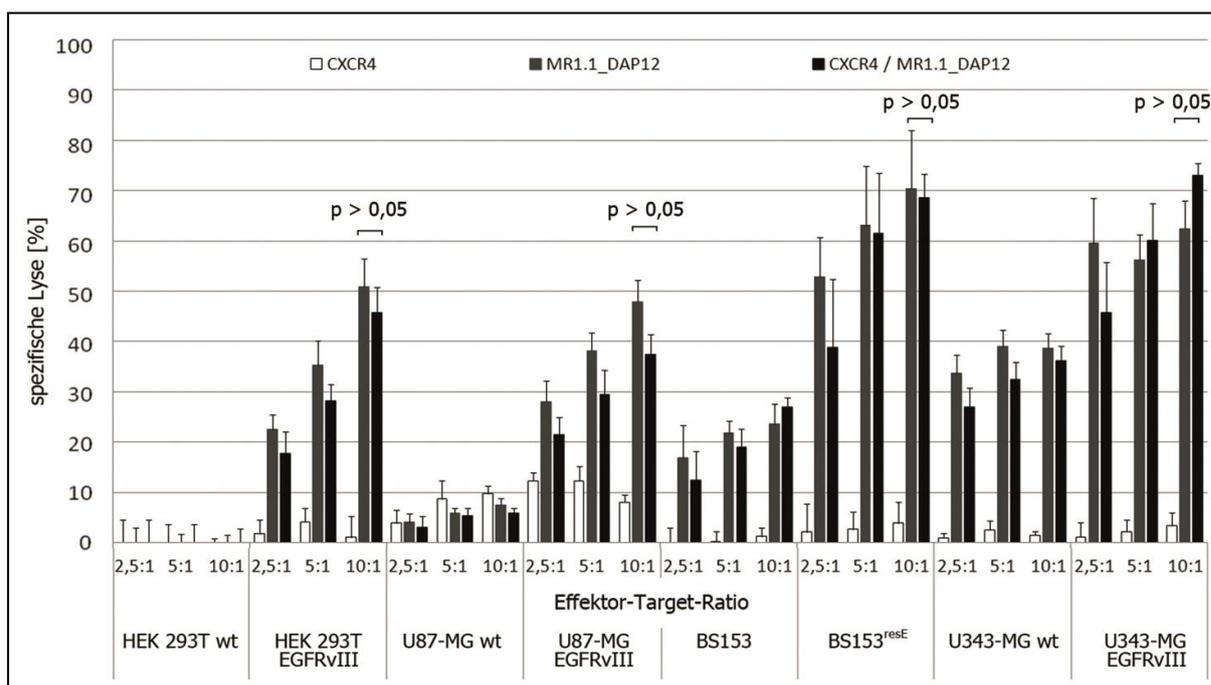


Abbildung 27 *in vitro* Zytotoxizität von CAR-armierten und CXCR4 positiven YTS gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. CXCR4-positive YTS, mit MR1.1_DAP12 armierte YTS und mit MR1.1_DAP12 und CXCR4-Chemokinrezeptor kotransduzierte YTS wurden im Chromfreisetzung-Assay für 21 h mit verschiedenen Tumorzelllinien kokultiviert, die entweder Wildtypzellen waren oder den EGFRvIII als Antigen präsentierten. EGFRvIII-positive Tumorzellen wurden spezifisch lysiert. Der Unterschied der Lyseraten von YTS MR1.1_DAP12 und YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 war bei einer Effektor-Target-Ratio von 10:1 nicht signifikant. Die Abbildung zeigt Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten.

Weder die Wildtyp-Zielzellen noch die EGFRvIII-positiven Zielzelllinien wurden durch CXCR4-positive YTS spezifisch lysiert, die Hintergrundlyse lag bei maximal 12 %. Der in Abbildung 27 dargestellte Vergleich von YTS MR1.1_DAP12 mit YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 zeigte, dass die Lyse von EGFRvIII-positiven Zielzellen durch die doppelt transduzierten YTS etwas geringer ausfiel als durch die einfach transduzierten YTS MR1.1_DAP12. Der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Lyse vergleichbar effizient ist. Auch in diesem Versuch wurde deutlich, dass die schwach EGFRvIII-positiven parentalen BS153 und die Wildtyp-U343-MG zu einem Anteil von maximal 25 % bzw. 40 % spezifisch abgetötet werden. Abschließend kann festgestellt werden, dass die Kotransduktion von CAR und Chemokinrezeptor nicht dazu führt, dass die Zytotoxizität von YTS-Effektorzellen geschwächt oder unspezifisch wird.

3.5.2.4 Nachweis der Degranulation in NK-Zellen – CD107a-Freisetzung

Als Resultat der Induzierung des zytotoxischen Potentials von primären humanen NK-Zellen wurde untersucht, ob eine Kokultivierung mit Zielzellen zu einer Degranulation führt. U87-MG wt und U87-MG^{EGFRvIII} wurden, wie in Kapitel 2.5.8.2 beschrieben, mit für 48 h gehungerten, CAR-arnierten NK-Zellen von zwei gesunden Spendern in einem Verhältnis von 1:1 kokultiviert und die Freisetzung von Granula durch Zugabe von Monensin gehemmt. Als Negativkontrolle wurden NK-Zellen ohne Zielzellen in FKS-freiem Medium mitgeführt. 30 Minuten vor Ende der Kokultivierungszeit wurden die Zellen mit einem PE-gekoppelten anti-CD107a-Antikörper und der entsprechenden Isotypkontrolle gefärbt. Nach 6 h wurden die NK-Zellen abgenommen, je 200.000 Zellen am Durchflusszytometer analysiert (siehe Kapitel 2.5.5) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der Färbungen bestimmt. Die Werte wurden normalisiert, die Mediumkontrolle der NK-Zellen ohne Zielzellen diente als relativer Vergleichswert. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, Abbildung 28 zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

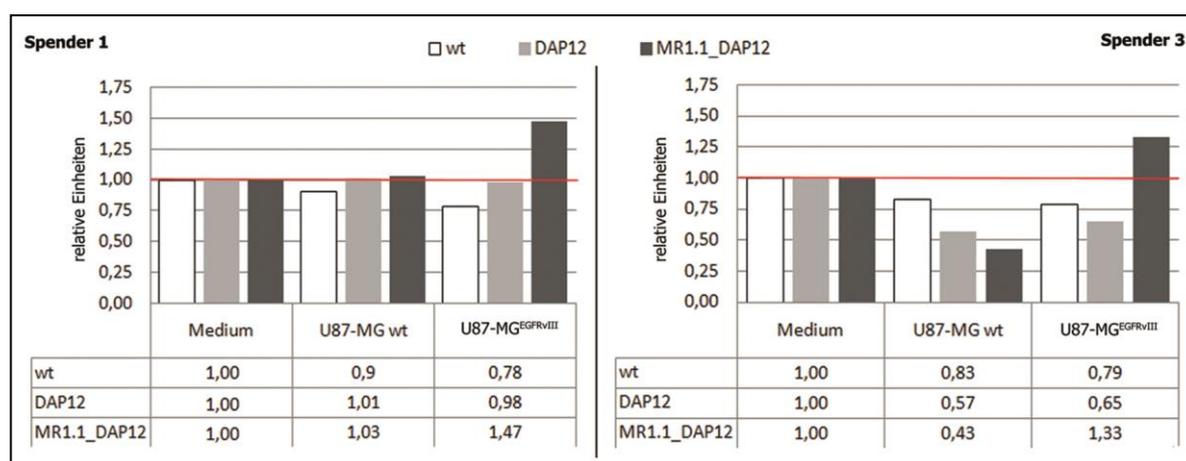


Abbildung 28 *in vitro* Degranulation von CAR-arnierten NK-Zellen nach Kokultivierung mit U87-MG wt bzw. EGFRvIII positiven U87-MG. Wildtyp-NK-Zellen und CAR-arnierte NK-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden für 6 h mit U87-MG kokultiviert, die entweder Wildtypzellen waren oder den

EGFRvIII auf ihrer Oberfläche exprimierten. Eine anschließende durchflusszytometrische Analyse mit einem anti-CD107a-Antikörper wurde durchgeführt und die Werte der MFI gegen die Mediumkontrolle (NK-Zellen ohne Zielzellen) normalisiert. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis.

Die isolierten, expandierten und aktivierten NK-Zellen zeigten aufgrund der Kultivierung bzw. des Transduktionsstresses eine basale Degranulation, die unabhängig von der Präsenz von potentiellen Zielzellen war. Daher dienten NK-Zellen in der Mediumkontrolle als Vergleichswert für die Degranulationsmessung. Alle anderen Messwerte wurden zu dieser basalen Degranulation in Relation gesetzt. Die Kokultivierung der primären humanen NK-Zellen führte nur dann zu einer verstärkten Ansammlung von CD107a auf der Oberfläche der Effektorzellen, wenn die Zielzellen den EGFRvIII exprimierten und die NK-Zellen mit dem funktionellen Igκ_MR1.1_DAP12 transduziert worden waren. Bei Spender 1 führte die Kokultivierung dieser Zellen zu einer um fast 50 % gesteigerten Degranulation, bei Spender 3 erhöhte sich die Degranulation um 33 %. Die Kokultivierung von U87-MG Wildtypzellen mit NK MR1.1_DAP12 führte nicht zur verstärkten Freisetzung von Granula, ebenso wenig wie die Kokultivierung von Zielzellen mit NK-Zellen, die mit dem Kontrollkonstrukt Igκ_DAP12 oder überhaupt nicht transduziert worden waren. Bei Spender 3 zeigte sich sogar eine Abnahme der Degranulation bei den mit CAR transduzierten Zellen. Möglich wäre, dass die aufwändige Behandlung und *ex vivo* Kultivierung die primären Zellen stressen und somit zu einer verringerten Aktivität führen. Diese negativen Effekte wurden allerdings, wie bereits erwähnt, kompensiert, wenn das passende Antigen für den funktionellen CAR präsentiert wurde.

3.5.2.5 Überprüfung der INFγ-Sekretion durch NK-Zellen

Ein anderes Kokultivierungsexperiment sollte nicht nur die Degranulation sondern auch die Freisetzung von zytotoxischen Zytokinen durch die CAR-armierten primären humanen NK-Zellen zeigen. U87-MG Wildtyp-Zellen bzw. U87-MG^{EGFRvIII} und CAR-armierte NK-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden, wie in Kapitel 2.5.8.3 beschrieben, in einem Effektor-Target-Verhältnis von 1:5 für 6 h kokultiviert. Eine Mediumkontrolle von NK-Zellen ohne Zielzellen wurde mitgeführt. Nach Ende der Kokultivierungszeit wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und ein INFγ-ELISA durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.8). Der Versuch wurde mit 1:500 verdünntem ZKÜ dreimal durchgeführt, jede Messung erfolgte als Duplett. Der INFγ-Gehalt des ZKÜ wurde im Vergleich mit einer bekannten Standardkurve ermittelt und die Mittelwerte und Standardabweichungen („standard deviation“, S.D.) der Doppelbestimmung errechnet. Zudem wurde von den einzelnen Messwerten die Mediumkontrolle (NK-Zellen ohne Zielzellen) abgezogen. Abbildung 29 zeigt ein exemplarisches Ergebnis.

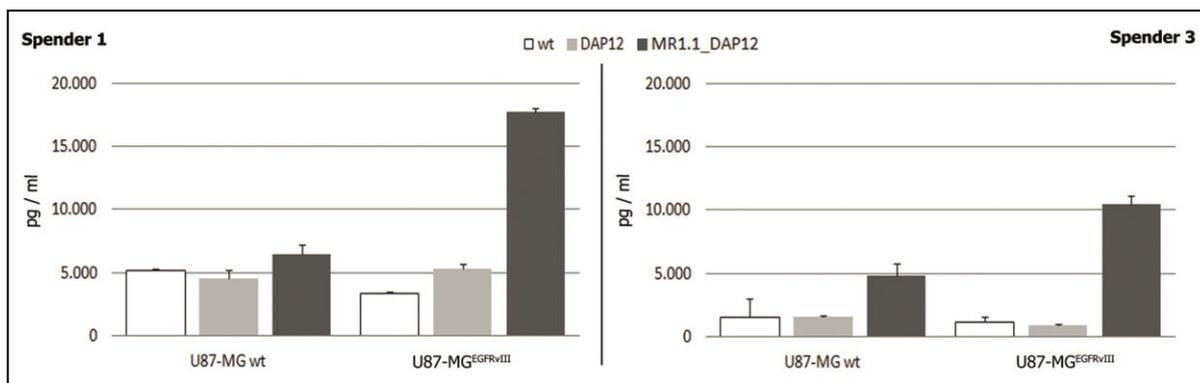


Abbildung 29 *in vitro* INF γ -Sekretion von CAR-armi­erten NK-Zellen nach Kokultivierung mit U87-MG wt bzw. EGFRvIII positiven U87-MG. Wildtyp-NK-Zellen und CAR-armi­erte NK-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden für 6 h mit U87-MG kokultiviert, die entweder Wildtypzellen waren oder den EGFRvIII auf ihrer Oberfläche exprimierten. Der Zellkulturüberstand wurde für einen ELISA eingesetzt und die Konzentration von sekretiertem INF γ bestimmt. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Auch im INF γ -ELISA zeigte sich, dass die isolierten, expandierten und aktivierten NK-Zellen aufgrund der Kultivierung bzw. des Transduktionsstresses bereits geringfügig aktiv sind und von sich aus INF γ sekretieren. Daher wurden auch hier NK-Zellen ohne Zielzellen als Vergleichswert für die INF γ -Bestimmung genutzt und deren basale INF γ -Sekretion für jede NK-Zell-Population (NK wt, NK DAP12, NK MR1.1_DAP12) von den entsprechenden Messwerten abgezogen.

Bei Spender 1 führte die Kokultivierung von NK MR1.1_DAP12 mit U87-MG^{EGFRvIII} zu einer Sekretion von über 15.000 pg / ml INF γ , während die Kontrollkultivierung mit U87-MG Wildtypzellen zu einer basalen Sekretion von 5.000 pg / ml INF γ führte. Diese Konzentration wurde auch in den ZKÜ von NK wt bzw. NK DAP12 bestimmt, unabhängig davon, ob sie mit U87-MG Wildtyp oder U87-MG^{EGFRvIII} kokultiviert worden waren. Bei Spender 3 war die basale INF γ -Sekretion wesentlich geringer, so dass die Aktivierung der NK MR1.1_DAP12 durch ihr Antigen nur zu einer Sekretion von 10.000 pg / ml INF γ führte. Zudem wurden die NK MR1.1_DAP12 leicht durch die U87-MG Wildtypzellen aktiviert, was andere Ursachen als die Antigenpräsentation haben muss. Dennoch war der Unterschied deutlich und nur NK-Zellen mit funktionellem CAR wurden durch EGFRvIII-positive Zielzellen zu einer erhöhten INF γ -Sekretion angeregt.

3.5.2.6 Chromfreisetzung-Assay mit NK-Zellen

Ob die gezeigte Aktivierung der Tötungsmechanismen wie Degranulation und INF γ -Sekretion ausreichte, um EGFRvIII-positive Zielzellen durch die CAR-armi­erten NK-Zellen spezifisch zu lysieren, wurde in einem Chromfreisetzung-Assay untersucht. Verschiedene Tumorzelllinien (Wildtyp und EGFRvIII-positiv) wurden mit ⁵¹Cr beladen und mit für 48 h gehungerten NK-Effektorzellen in unterschiedlichen Verhältnissen (Effektor-Target-Ratio) für 4 - 8 h kokultiviert. Die Versuche wurden mit NK-Zellen von zwei verschiedenen

Spendern für alle Zelllinien dreimal und in Triplets wiederholt. Jedoch wird auch hier nur ein repräsentatives Ergebnis gezeigt. Die Mittelwerte der Dreifachbestimmung einer Messung und die Standardabweichung („standard deviation“, S.D.) wurden berechnet und in Abbildung 30 dargestellt.

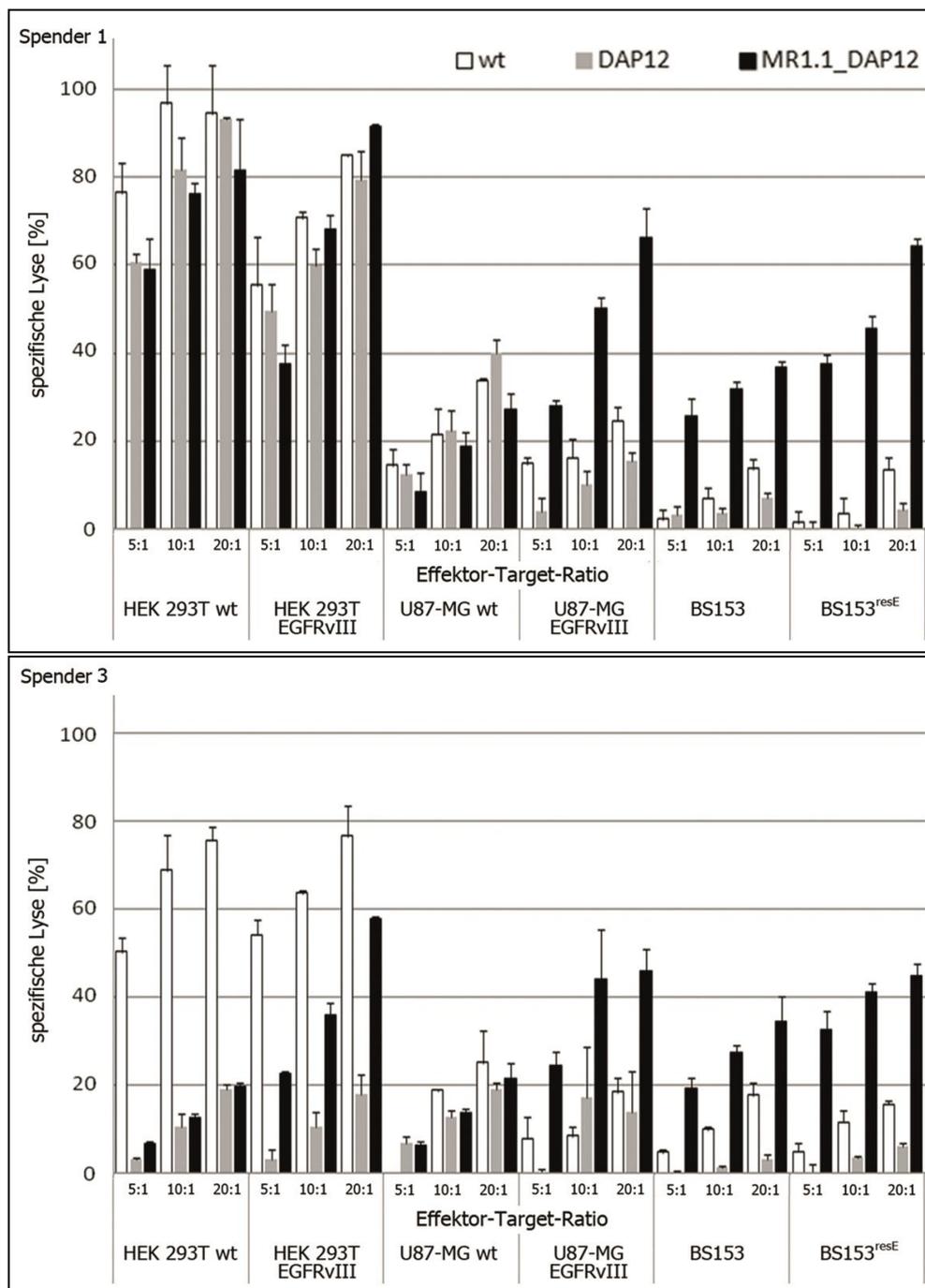


Abbildung 30 *in vitro* Zytotoxizität von NK-Zellen gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien. Wildtyp-NK-Zellen und CAR-armierte NK-Zellen von zwei gesunden Spendern wurden im Chromfreisetzungs-Assay für 4 - 8 h mit verschiedenen Tumorzelllinien kokultiviert, die entweder Wildtypzellen waren oder den EGFRvIII auf ihrer Oberfläche exprimierten. Abgebildet ist für jeden Spender ein repräsentatives Ergebnis.

Der Chromfreisetzung-Assay mit primären NK-Zellen zeigte in Abbildung 30 deutlich die Unterschiede von NK-Zellen verschiedener Spender in der Zielzellerkennung aufgrund der in Abbildung 7 dargestellten, ihnen jeweils eigenen Ausstattung mit aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren. NK-Zellen von Spender 1 lysierten HEK 293T Wildtypzellen unabhängig von der Transduktion mit CAR oder der Expression von EGFRvIII zu fast 100 %. Diese unspezifische Lyse war konzentrationsabhängig und nahm mit steigendem Effektor-Target-Verhältnis leicht zu. Es wurde dabei deutlich, dass die unbehandelten NK-Wildtypzellen eine leicht höhere Befähigung zur Lyse hatten als die transduzierten NK-Zellen, deren Lyserate durch die Armierung mit Igκ_{MR1.1_DAP12} nur unwesentlich gesteigert wurde. U87-MG wurden hingegen von den CAR-armierten NK-Zellen des Spenders 1 spezifisch lysiert. Auch hier war die unspezifische Hintergrundlyse, wie in Abbildung 30 sichtbar, bei U87-MG Wildtypzellen mit bis zu 40 % bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 20:1 relativ hoch. Doch NK MR1.1_DAP12 waren während der Kokultivierung zu einer Steigerung der spezifischen Lyse von EGFRvIII-positiven Zielzellen auf bis zu 65 % befähigt, während die Kontroll-NK-Zellen die EGFRvIII-positiven U87-MG nicht verstärkt abtöteten. Am deutlichsten ausgeprägt war die Spezifität und Effizienz der Zytotoxizität von NK MR1.1_DAP12 des Spenders 1 bei den primären Gliomzellen BS153. Diese Zellen wurden von den Wildtyp- und Igκ_{DAP12}-NK-Zellen zu maximal 10 % unspezifisch lysiert. NK MR1.1_DAP12 lysierten die parentalen BS153 mit geringer EGFRvIII-Expression zu bis zu 38 %. BS153^{resE}, die den EGFRvIII überexprimieren, wurden erkannt und bis zu 62 % spezifisch abgetötet.

Die NK-Zellen von Spender 3 reagierten auf die Tumorzelllinien im Chromfreisetzung-Assay etwas spezifischer. HEK 293T wurden von NK MR1.1_DAP12 nur zu maximal 20 % unspezifisch lysiert. Bei HEK 293T^{EGFRvIII} wurde eine spezifische Lyserate von circa 60 % bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 20:1 erreicht. Im gezeigten Experiment waren jedoch die Wildtyp-NK-Zellen wesentlich reaktiver als die CAR-transduzierten NK-Zellen. Sie lysierten die Zielzellen unspezifisch. U87-MG^{EGFRvIII} wurden spezifisch von den NK MR1.1_DAP12 des Spenders 3 lysiert, die Lyserate betrug bis zu 50 %, während alle Kontrollen U87-MG Wildtypzellen bzw. U87-MG^{EGFRvIII} zu maximal 25 % lysierten. Ähnlich spezifische Lyseraten und Hintergrundlysen wurden bei den primären Gliomzellen BS153 erreicht. Hier wurden bis zu 45 % der BS153^{resE} spezifisch von NK MR1.1_DAP12 lysiert. Bei parentalen BS153 lag die Lyserate bei maximal 35 %, während die Kontrollkonstrukte die Zielzellen nur bis zu 20 % unspezifisch abtöteten.

Die Experimente zeigten, dass unabhängig von der Art der Tumorzelllinien in CAR-armierten YTS- oder NK-Zellen eine zytotoxische Reaktion erzeugt wird und somit spezifische Lysen erreicht werden können. Die durch den chimären Antigenrezeptor vermittelte Zytotoxizität ist spezifisch und abhängig davon, dass das passende Antigen präsentiert wird. EGFRvIII-negative Tumorzellen werden auf diese Weise nicht lysiert. Unspezifische Hintergrundlysen müssen andere Ursachen haben. Im nächsten Kapitel soll

untersucht werden, ob sich diese *in vitro* Ergebnisse auch im lebenden Organismus reproduzieren lassen.

3.6 *IN VIVO* MIGRATION SYSTEMISCH APPLIZIERTER YTS-EFFEKTORZELLEN ZU ETABLIERTEN SUBKUTANEN TUMOREN

Um die Befähigung CXCR4-positiver YTS-Zellen zur Migration *in vivo* zu überprüfen, wurden NMRI_{NuNu}-Mäuse mit $1,5 \times 10^6$ SDF-1 α sekretierenden U87-MG^{EGFR^{vIII}} Gliomzellen bzw. mit EGFP-transduzierten Kontrollzellen subkutan angeimpft. Je 4×10^6 mit DsRed markierte YTS-Wildtypzellen oder YTS CXCR4 wurden fünfmal alle zwei Tage in die Schwanzvene injiziert. Die Tumore wurden nach dem zweiwöchigen Untersuchungszeitraum entnommen, eingebettet, geschnitten und mit Dapi und Vectashield Mounting Medium eingedeckelt. Die Schnitte wurden am Fluoreszenzmikroskop LSM510 (Zeiss) mit einer 40-fachen Vergrößerung analysiert und je fünf Z-Stacks an zufällig ausgewählten Bereichen des Tumors durch den gesamten Schnitt angefertigt. Die Bilder wurden per ImageJ (NIH, USA) übereinandergelegt (exemplarische Bildaufnahmen sind in Abbildung 31 dargestellt) und die DsRed-exprimierenden YTS-Zellen dieser Kompositen ausgezählt. Der Mittelwert und die Standardabweichung („standard deviation“, S.D.) von eingewanderten YTS-Wildtypzellen und CXCR4-positiven YTS-Zellen wurde ermittelt sowie die statistische Signifikanz der Unterschiede mit dem Student's t-Test berechnet. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 32.

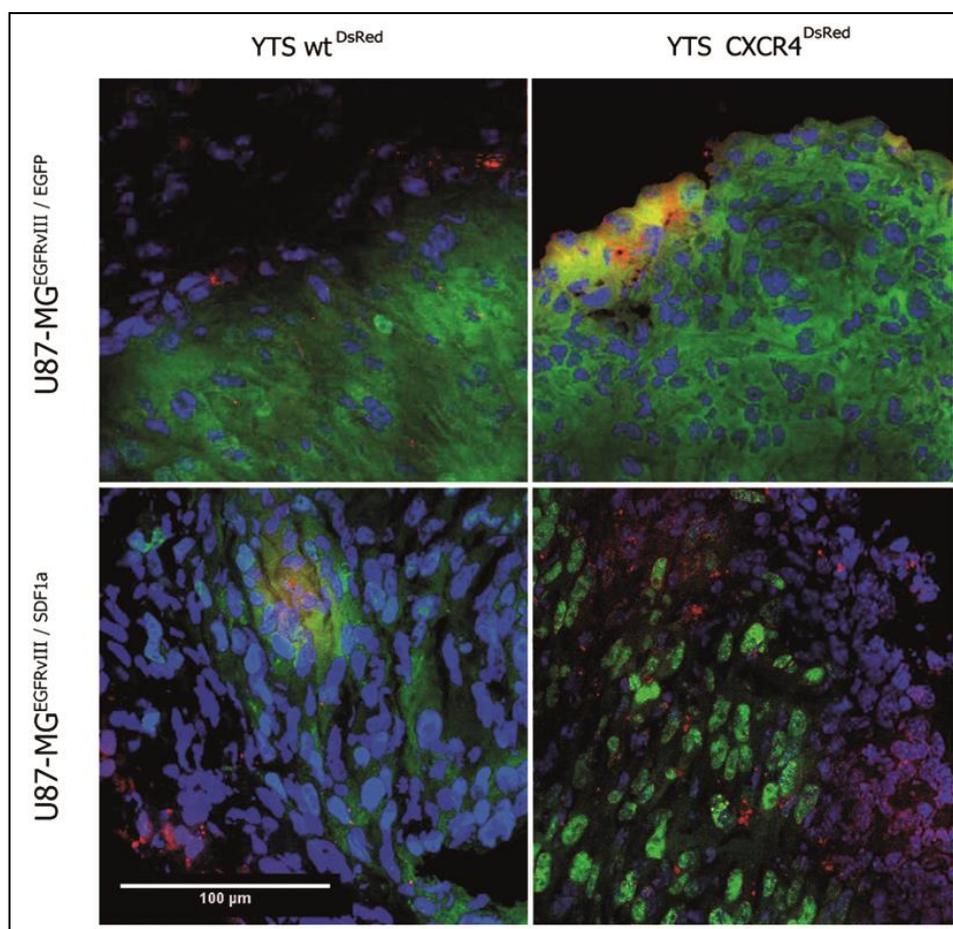


Abbildung 31 *in vivo* Migration von YTS-Zellen zu SDF-1 α sekretierenden U87-MG. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von 10 μ m-Kryoschnitten. 1×10^6 U87-MG^{EGFRvIII} / EGFP oder U87-MG^{EGFRvIII} / SDF-1 α wurden subkutan in die Flanke von NMRI_{NuNu}-Mäusen injiziert. Nachdem die Tumore angewachsen waren, wurden jeweils 4×10^6 YTS Wildtyp^{DsRed} oder YTS CXCR4^{DsRed} fünfmal alle zwei Tage intravenös appliziert. Die Tumore wurden anschließend entnommen und fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Die Abbildung zeigt repräsentative Bilder.

Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder der Tumorschnitte zeigten die Zellkerne (blau), die EGFP-exprimierenden Tumorzellen (grün) und YTS-Zellen (rot). Deutlich wurde, dass sich um die meisten Tumore eine Bindegewebsschicht bildet, die nicht aus Tumorzellen besteht, d. h. kein EGFP exprimiert, sondern wahrscheinlich aus rekrutierten Hautzellen und Fibroblasten der Mäuse. Die Tumore selbst waren sehr dicht und kompakt und hatten einen scharf definierten Rand. An den Tumorrändern und in der Bindegewebsschicht waren sowohl bei SDF-1 α -sekretierenden Tumoren als auch bei den EGFP-exprimierenden Kontrolltumoren sowohl YTS wt als auch YTS CXCR4 Zellen auffindbar, die über den Blutstrom in die Haut der Mäuse und zum Tumor gelangt waren. Alle YTS-Zellen waren prinzipiell dazu befähigt, zum Tumor zu gelangen und sich an die Randbereiche der Tumore anzulagern. Doch nur YTS CXCR4 gelang es, entlang des immer stärker werdenden Chemokingradienten tief in die SDF-1 α sekretierenden Tumore einzuwandern und sich dort anzureichern.

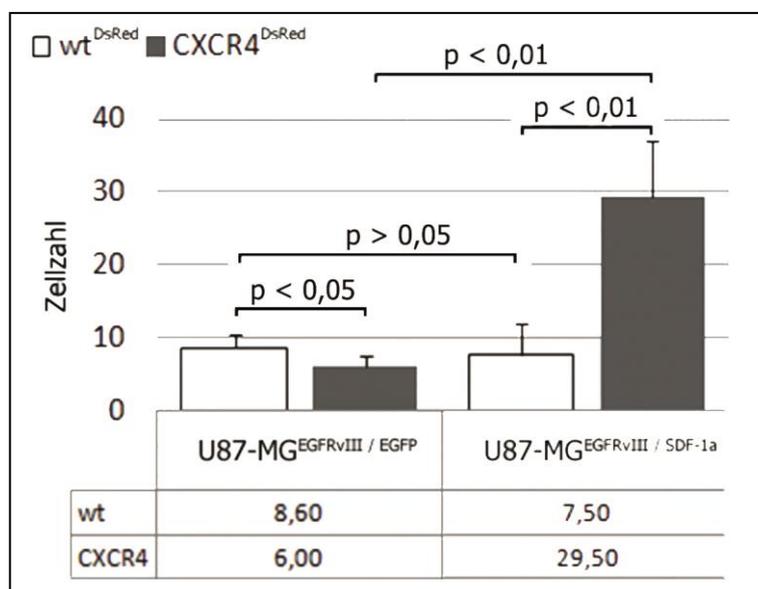


Abbildung 32 *in vivo* Migration von YTS-Zellen zu SDF-1 α sekretierenden U87-MG. Auszählung der eingewanderten Zellen in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der 10 μ m-Kryoschnitte. Jeweils fünf fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden in vier z-Stacks übereinandergelegt und die im Sichtfeld liegenden roten YTS-Zellen in den Tumoren ausgezählt. Die Mittelwerte der Zellzahlen sowie Standardabweichungen wurden berechnet und die statistische Signifikanz der Unterschiede mit dem Student's t-Test ermittelt.

Die Auszählung von DsRed-markierten YTS-Zellen in vier Z-Stacks mit je fünf verschiedenen Aufnahmen der Tumore bestätigte den ersten mikroskopischen Eindruck. Fast 30 YTS CXCR4 konnten durchschnittlich pro Bildausschnitt des SDF-1 α sekretierenden Tumors gezählt werden, während in allen Kontrollen nicht mehr als 9 YTS-Zellen pro Z-Stack gezählt wurden. Dabei war der Unterschied der in SDF-1 α -sekretierende Tumore eingewanderten YTS wt zu YTS CXCR4 sehr signifikant. Auch der Unterschied von YTS CXCR4, die entweder in EGFP-positive oder in SDF-1 α -sekretierende Tumore einwanderten, war sehr signifikant. Dagegen gab es keinen signifikanten Unterschied im Einwanderungsverhalten von YTS wt in EGFP-positive oder in SDF-1 α sekretierende Tumore. Lediglich das Einwanderungsverhalten von YTS wt und YTS CXCR4 in EGFP-positive Tumore zeigte einen signifikanten Unterschied, der nicht in der CXCR4 / SDF-1 α -Achse begründet sein dürfte. Damit ergab die mikroskopische Auswertung, dass CXCR4-positive Effektorzellen *in vivo* einem chemotaktischen SDF-1 α -Gradienten folgen und sich an dessen Quelle anreichern können.

3.7 IN VIVO ZYTOTOXIZITÄT

3.7.1 Subkutane Koinjektion von Zielzellen und YTS-Effektorzellen

Um festzustellen, ob die YTS-Effektorzellen nicht nur *in vitro* sondern auch *in vivo* in der Lage waren, EGFR^{vIII}-positive Tumorzellen effektiv zu eliminieren, wurde in einem ersten Tierversuch eine Koinjektion von Effektorzellen und Zielzellen durchgeführt. 1×10^6 U87-MG^{EGFR^{vIII}} in PBS und je nach Gruppe keine YTS oder 4×10^6 YTS wt, YTS DAP12, YTS MR1.1_DAP12^{mut} oder YTS MR1.1_DAP12 wurden vermischt und 100 μ l dieser Zellsuspension NMRI^{NuNu}-Mäusen subkutan in die rechte Flanke injiziert. Aller fünf Tage wurde der Tumor in Länge und Breite vermessen und das Tumorareal mit der in Kapitel 2.6 genannten Formel bestimmt. Die Mittelwerte der Gruppen wurden für einen definierten Zeitpunkt (Tag 30) in einem Diagramm aufgetragen und eine Überlebenskurve erstellt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt, ein repräsentatives Ergebnis samt statistischer Auswertung zeigt Abbildung 33.

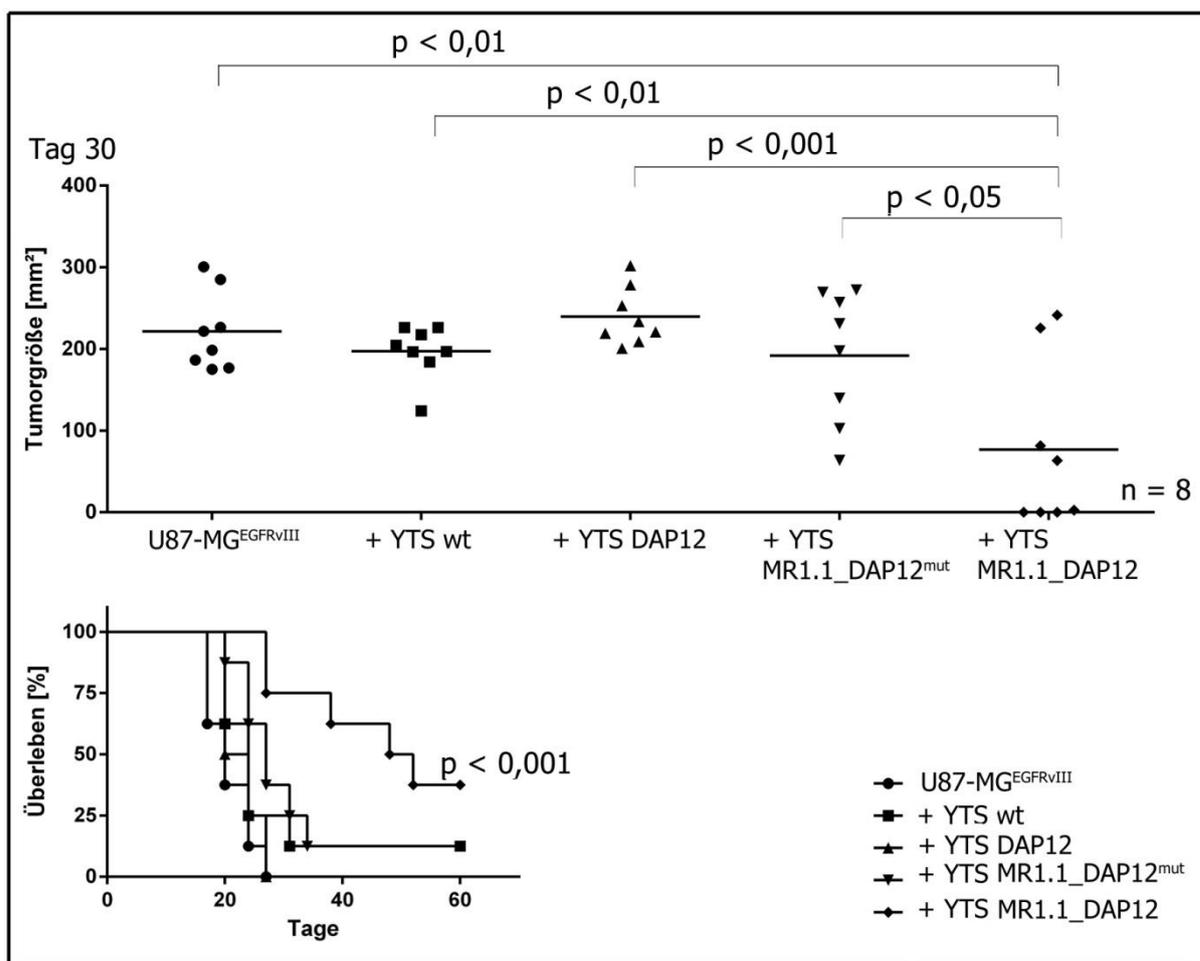


Abbildung 33 *in vivo* Zytotoxizität von YTS-Zellen gegen U87-MG^{EGFRvIII} bei subkutaner Koinjektion. 1×10^6 U87-MG^{EGFRvIII} wurden allein oder vermischt mit jeweils 4×10^6 YTS Wildtyp, YTS DAP12, YTS MR1.1_DAP12^{mut} bzw. YTS MR1.1_DAP12 subkutan in die Flanke von NMRI^{NuNu}-Mäusen injiziert und die Tumorareale vermessen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Die Resultate dieses ersten Versuchs waren sehr vielversprechend. Es wurde deutlich, dass die Koinjektion von Zielzellen und YTS MR1.1_DAP12-Effektorzellen zu einem signifikant verringerten Tumorwachstum führte. Eine komplette Tumorregression gelang bei vier Mäusen. Dabei war der Unterschied der Gruppen ohne YTS, mit YTS wt und mit YTS DAP12 zu YTS MR1.1_DAP12 sehr signifikant und der Unterschied zwischen YTS MR1.1_DAP12^{mut} und YTS MR1.1_DAP12 höchst signifikant. Die Zielzellen wurden erfolgreich erkannt und lysiert, was zu höchst signifikant verbesserten Überlebensraten in dieser Gruppe führte. Dies bedeutet, dass im Prinzip YTS-Zellen mit funktionellem α -EGFRvIII-CAR auch im lebenden Organismus überleben und funktionell bleiben.

3.7.2 Systemische Therapie von etablierten subkutanen Tumoren mit YTS-Effektorzellen

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Immuntherapie gegen EGFRvIII-positive Tumore auch funktioniert, wenn der Tumor bereits etabliert ist und die Effektorzellen durch intravenöse Injektionen verabreicht werden. 1×10^6 U87-MG^{EGFRvIII} in 100 μ l PBS wurden subkutan in die rechte Flanke von NMRI_{NuNu}-Mäusen injiziert. Nach fünf Tagen waren die Tumorzellen angewachsen und es wurde mit einer systemischen Therapie begonnen. Alle zwei Tage wurden entweder keine oder jeweils 4×10^6 der verschiedenen YTS-Effektorzellen in 100 μ l PBS in die Schwanzvene injiziert und das Tumoreal mit der in Kapitel 2.6 genannten Formel bestimmt. Die Mittelwerte der Gruppen am Tag 30 wurden in einem Diagramm aufgetragen und eine Überlebenskurve erstellt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Abbildung 34 zeigt ein repräsentatives Ergebnis samt statistischer Auswertung.

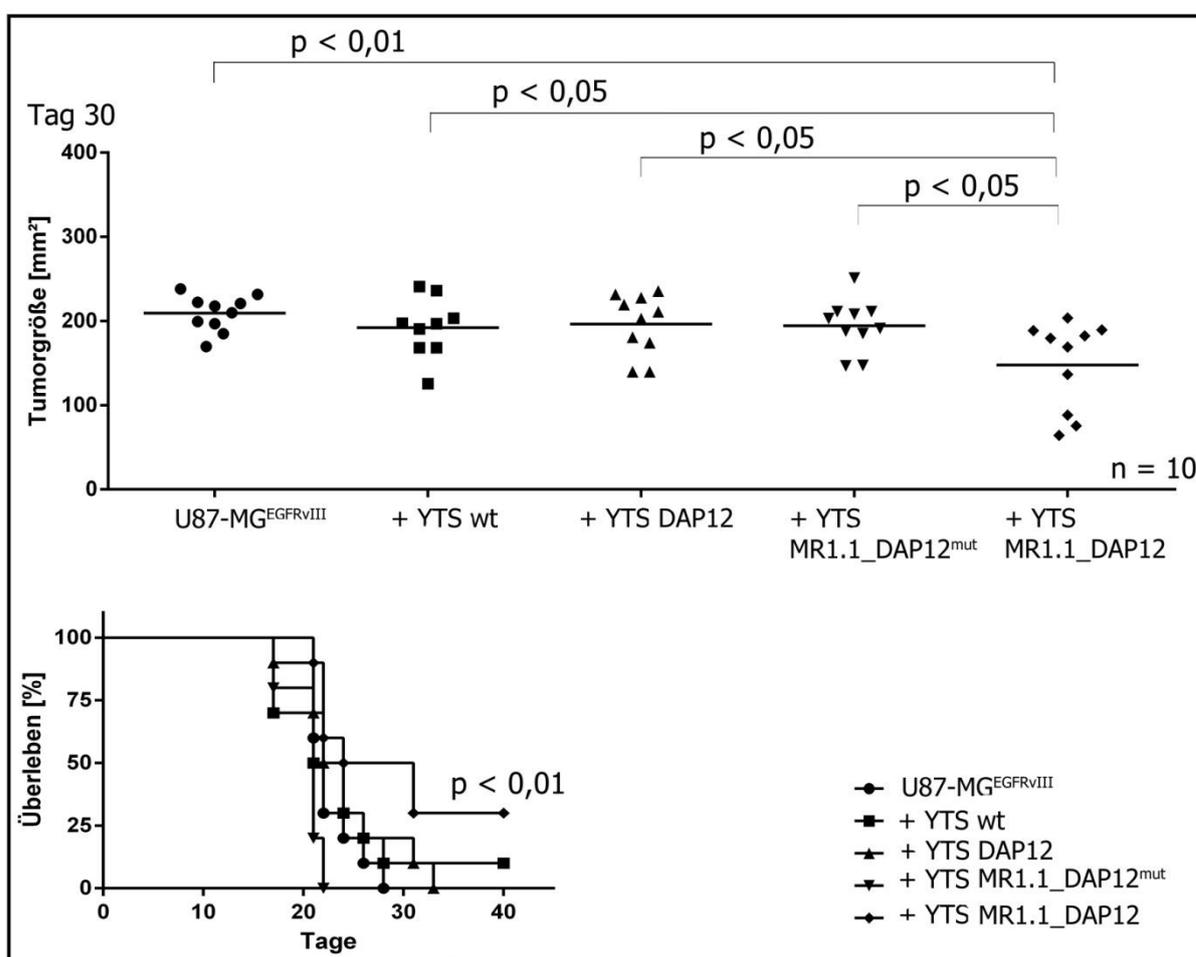


Abbildung 34 *in vivo* Zytotoxizität von YTS-Zellen gegen etablierte Tumore von U87-MG^{EGFRvIII} bei systemischer Applikation. 1×10^6 U87-MG^{EGFRvIII} wurden subkutan in die Flanke von NMRI_{NuNu}-Mäusen injiziert. Nachdem die Tumore angewachsen waren, wurden keine oder jeweils 4×10^6 YTS Wildtyp, YTS DAP12, YTS MR1.1_DAP12^{mut} bzw. YTS MR1.1_DAP12 alle zwei Tage intravenös appliziert und die Tumoreareale vermessen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

Auch bei diesem Versuch zeigte sich ein verringertes Tumorwachstum in der Gruppe der Mäuse, die mit YTS MR1.1_DAP12 behandelt wurden. Deren Tumore waren sehr signifikant kleiner als die der unbehandelten Mäuse und signifikant kleiner als die Tumore aller anderen Kontrollgruppen. Es wurde keine Tumorregression erreicht, aber bei drei Tieren blieb das Tumorareal konstant unter 100 mm². Zudem überlebten die mit YTS MR1.1_DAP12 behandelten Mäuse sehr signifikant länger als die Mäuse der anderen Kontrollgruppen.

3.7.3 Kombination von Migration und Zytotoxizität modifizierter YTS-Effektorzellen zur systemischen Therapie von etablierten subkutanen Tumoren

Im dritten Versuch wurde schließlich überprüft, ob eine Therapie mit kotransduzierten YTS-Zellen, die sowohl den funktionellen α -EGFRvIII-CAR als auch den CXCR4-Chemokinrezeptor tragen, zu einer verbesserten Therapie von etablierten Tumoren führt. Ziel war, zu zeigen, dass die CXCR4-positiven YTS besser zu SDF-1 α -sekretierenden Tumoren migrieren und diese damit effektiver eliminieren können als YTS, die nur mit Ig κ _MR1.1_DAP12 transduziert wurden.

Pro Maus wurden $1,5 \times 10^6$ U7-MG-Gliomzellen mit Koexpression von EGFRvIII und SDF-1 α subkutan injiziert. Nach fünf Tagen begann die systemische Therapie durch die intravenöse Applikation der Effektorzellen. Eine Maus in der Gruppe, die mit YTS MR1.1_DAP12 therapiert werden sollte, musste aus der Untersuchung ausgeschlossen werden, da kein Tumor angewachsen war. Das Tumorareal wurde mit der in Kapitel 2.6 genannten Formel bestimmt. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt. Abbildung 35 zeigt ein repräsentatives Ergebnis samt statistischer Auswertung für Tag 30 und Tag 45 sowie die Überlebenskurve.

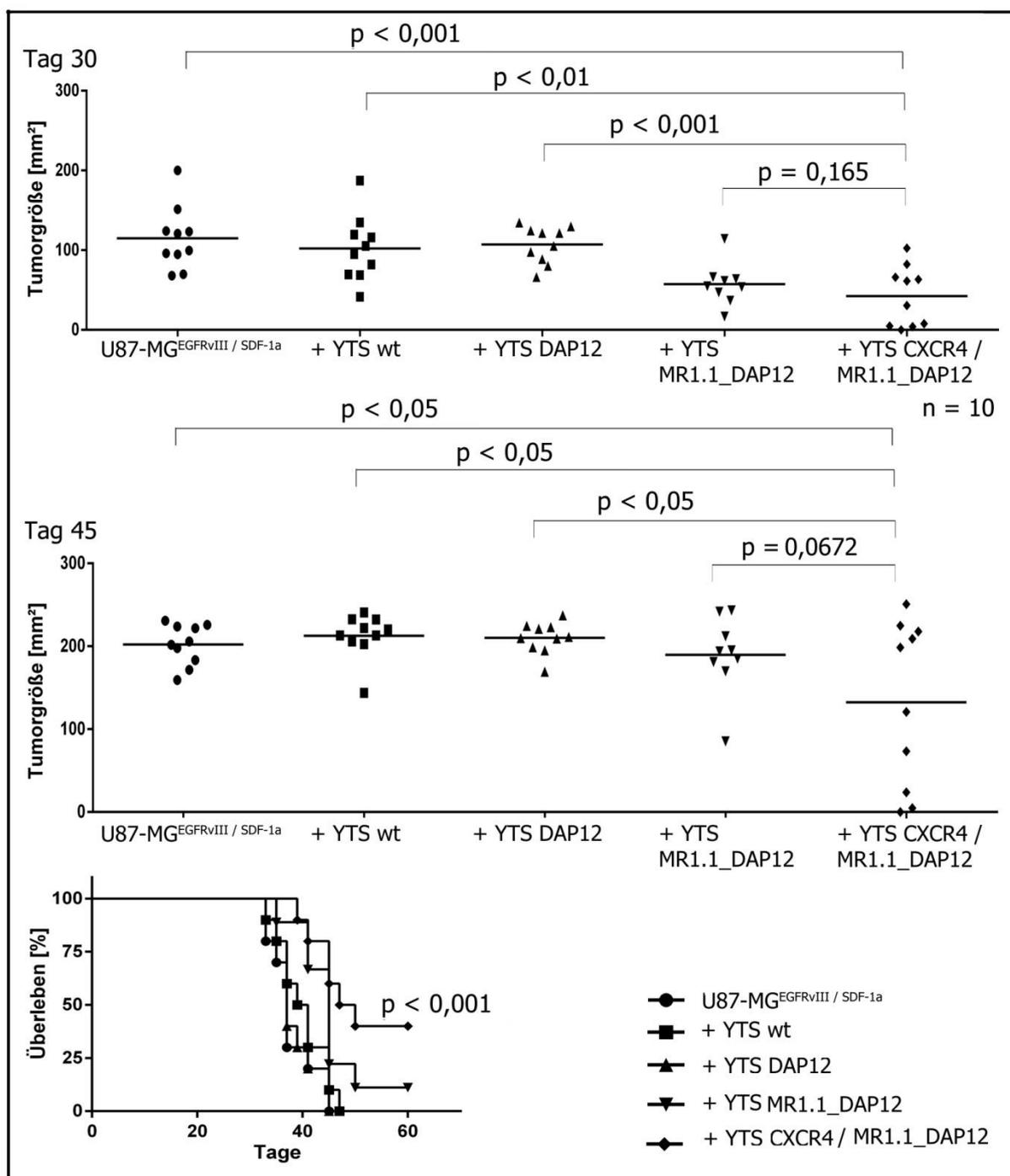


Abbildung 35 *in vivo* Zytotoxizität von YTS-Zellen gegen etablierte Tumore von U87-MG^{EGFR^{VIII}} / SDF-1 α bei systemischer Applikation. 1,5 x 10⁶ U87-MG^{EGFR^{VIII}} / SDF-1 α wurden subkutan in die Flanke von NMR1_{NuNu}-Mäusen injiziert. Nachdem die Tumore angewachsen waren, wurden keine oder jeweils 4 x 10⁶ YTS Wildtyp, YTS DAP12, YTS MR1.1_DAP12 bzw. YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 aller zwei Tage intravenös appliziert und das Tumorareal vermessen. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen Experiments.

In diesem Versuch wurde deutlich, dass die durch die Ergebnisse im klonalen Überlebensassay (siehe Abbildung 15) definierte Erhöhung der applizierten Tumorzellen mit zusätzlicher SDF-1 α -Sekretion um 50 % nicht ausreichte, um das verlangsamte Wachstum der doppelt transduzierten U87-MG gegenüber U87-MG mit EGFRvIII-Expression allein auszugleichen. Nach 30 Tagen war das bei den vorangegangenen Experimenten bestimmte maximale Tumorareal von circa 200 mm² und damit der Endpunkt des Experiments noch nicht erreicht. Doch in der Tendenz war das Ergebnis dieses Versuchs vergleichbar mit den vorangegangenen Experimenten. Am Tag 30 zeigten Mäuse, die mit YTS MR1.1_DAP12 oder YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 therapiert wurden, eine höchst signifikant verringerte Tumorgroße gegenüber den Kontrollgruppen, doch die Tumorareale innerhalb dieser beiden Gruppen unterschieden sich nicht. Ein Unterschied zwischen den mit YTS MR1.1_DAP12 oder YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 therapierten Gruppen entwickelte sich erst über einen längeren Zeitraum. Am Tag 45 wurde deutlich, dass die Therapie mit YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 zu einer kompletten Tumorregression bei zwei Mäusen geführt hatte. Zwei weitere Tumore blieben unter 100 mm² groß, während dies nur bei einer Maus gelang, die mit YTS MR1.1_DAP12 behandelt worden war. Der Unterschied war deutlich, jedoch aufgrund der großen Varianz innerhalb der Gruppe mit dem angewendeten einseitigen t-Test noch nicht statistisch signifikant ($p = 0,0672$). Einen höchst signifikanten Unterschied gab es jedoch in den Überlebensraten der verschiedenen Gruppen. Während nach 60 Tagen nur eine Maus aus der YTS MR1.1_DAP12 Gruppe lebte, lebten noch vier Mäuse der YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 Gruppe und hatten somit einen großen Überlebensvorteil im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

4 DISKUSSION

Das Immunsystem kann auf vielfältige Weise für eine Therapie von Krebserkrankungen genutzt werden. Die Effektivität einer adoptiven Immuntherapie wird jedoch oft durch die schwache Immunogenität der Krebszellen und durch den immunsupprimierten Zustand der Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium eingeschränkt. Möglichkeiten, das Immunsystem zu stärken, wurden bereits in verschiedenen *in vitro*, *in vivo* und klinischen Studien untersucht. So können monoklonale Einzelkettenantikörper wie Herceptin oder Rituximap eingesetzt werden (Vacchelli2013b), jedoch mit der Limitation einer schwachen Tumorpenetration und langsamer Extravasation aus den Blutgefäßen (Keizer2010). Zudem gelangen sie als Makromoleküle kaum durch die Blut-Hirn-Schranke (Abbott2005, Dunn2007). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, spezifische tumorinfiltrierende Lymphozyten des Patienten zu isolieren, *ex vivo* zu expandieren und sie mittels adoptiven Transfers in den Patienten zurück zu überführen (Rosenberg1986). Hier liegt die Schwierigkeit vor allem darin, ausreichende Mengen autologer T-Lymphozyten mit passendem T-Zell-Rezeptor für tumorassoziierte Antigene zu finden und aufwachsen zu lassen. Zudem sind T-Zellen normalerweise auf die Präsentation von Antigenen durch MHC-Moleküle angewiesen (Eshhar2010). Nicht unwesentlich ist außerdem, dass klonal expandierte Zellen oft kurz nach dem adoptiven Transfer ihre Effektorfunktionen durch Evasionsstrategien des Tumors verlieren (Gattinoni2006, Töpfer2011).

Die Versuche, die Wirksamkeit der oben genannten Strategien zu erhöhen, führten zur Entwicklung von chimären Antigenrezeptoren (CAR). CAR vereinen die Vorteile der zellulären Therapieform wie die effiziente Tumorpenetration, die Zytotoxizität und die Freisetzung von stimulierenden Zytokinen, mit denen der humoralen Therapieform wie die sehr spezifische MHC-unabhängige Antigenerkennung (Eshhar2010). CAR werden generiert, indem der scFv-Anteil aus den variablen Ketten eines monoklonalen Antikörpers, der spezifisch gegen ein Tumorantigen gerichtet ist, mit der signalgebenden Untereinheit eines zellulären aktivierenden Rezeptors fusioniert wird. Den typischen Aufbau eines CAR zeigt Abbildung 3. Heute existieren T-Zell-CAR u. a. gegen CD30 auf Hodgkin-Lymphomen (Hombach2001), CEA auf kolorektalem Krebs (Hombach2006), HER-2/c-neu auf Eierstock- und Brustkrebs (Lindencrona2004), sowie IL13R (Kong2012) und EGFRvIII auf Glioblastomen (Morgan2012, Sampson2014). In den letzten Jahren haben sich in Studien zum adoptiven Transfer mit CAR gentechnisch veränderte T-Zellen im Kampf gegen Tumore als sicher und praktikabel erwiesen (Restifo2012). Natürliche Killer (NK)-Zellen sind eine andere Effektorzellpopulation des Immunsystems. Auch ihr sicherer Einsatz und ihr zytotoxisches Potential gegen Tumorzellen wurden *in vitro* und *in vivo* gezeigt (Review in Cheng2013). Doch ist auch bekannt, dass NK-Zellen im Vergleich zu anderen Immuneffektorzellen weniger stark in Tumorgewebe infiltrieren (Kmieciak2014). Ein Ansatz, der ihre Aktivität auf das auf primären Glioblastomen häufig exprimierte tumorassoziierte Antigen EGFRvIII (Wong1987) umlenkt

und zugleich ihr migratorisches Potential verbessert, erscheint also vielversprechend und soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden.

4.1 DIE EINGESETZTEN ZELLEN WERDEN DURCH UNTERSCHIEDLICHE OBERFLÄCHENMARKER CHARAKTERISIERT

Um die Kombination einer spezifischen Zytotoxizität mit gerichteter Chemotaxis überprüfen zu können, wurden HEK 293T und drei Gliomzelllinien (U87-MG, U343-MG, BS153) sowie die Leukämie-Zelllinie K562 als Zielzellen gewählt. Vor Beginn aller weiterführenden Arbeiten wurden sowohl diese Tumorzelllinien als auch die eingesetzten Effektorzellen (YTS-Zellen und primäre humane NK-Zellen) durch HLA-Typisierung und durchflusszytometrische Analyse charakterisiert (siehe Kapitel 3.1).

In der Literatur ist beschrieben, dass die Leukämie-Zelllinie K562 prinzipiell auch die genetische Information für HLA-Oberflächenmoleküle besitzt (*Adams2005*), doch gelangen diese nicht auf die Zelloberfläche. K562 waren in dieser Arbeit – wie auch von anderen Gruppen gezeigt (*Lozzio1975*) – bei einer durchflusszytometrischen Analyse MHC Klasse I-negativ. Sie sind daher eine häufig verwendete Zelllinie, um die intrinsische Zytotoxizität von NK-Zellen zu überprüfen, wie in Abbildung 25 gezeigt (*Imai2005, Sutlu2009, Cheng2013*). Für weitere Versuche wurden sie nicht genutzt. Aus dem Vergleich der Ziel- und Effektorzellen wurde deutlich, dass der HLA-Typ keiner Tumorzelllinie perfekt mit der KIR-Expression der Effektorzellen übereinstimmte (siehe Kapitel 3.1). Aus diesem „mismatch“ können sich CAR-unabhängige Aktivierungssignale für die NK-Zellen ergeben (*Ruggeri1999, Ruggeri2002, Igarashi2004*). Durch die Bindung von aktivierenden und inhibierenden NK-Zell-Rezeptoren an Oberflächenmoleküle auf den Tumorzellen wird die NK-Zell-Aktivität moduliert (*Cerwenka2001, Hallett2006, Lanier2008*). Die folgende Abbildung soll mögliche Interaktionen zwischen den für Untersuchungen der Zytotoxizität genutzten NK-Zellen der Spender 1 und 3 sowie YTS-Zellen und den Tumorzelllinien zusammenfassen. Da jedoch in Kapitel 3.1.1.2 nur einige exemplarische Oberflächenmoleküle durchflusszytometrisch untersucht wurden, erhebt sie keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

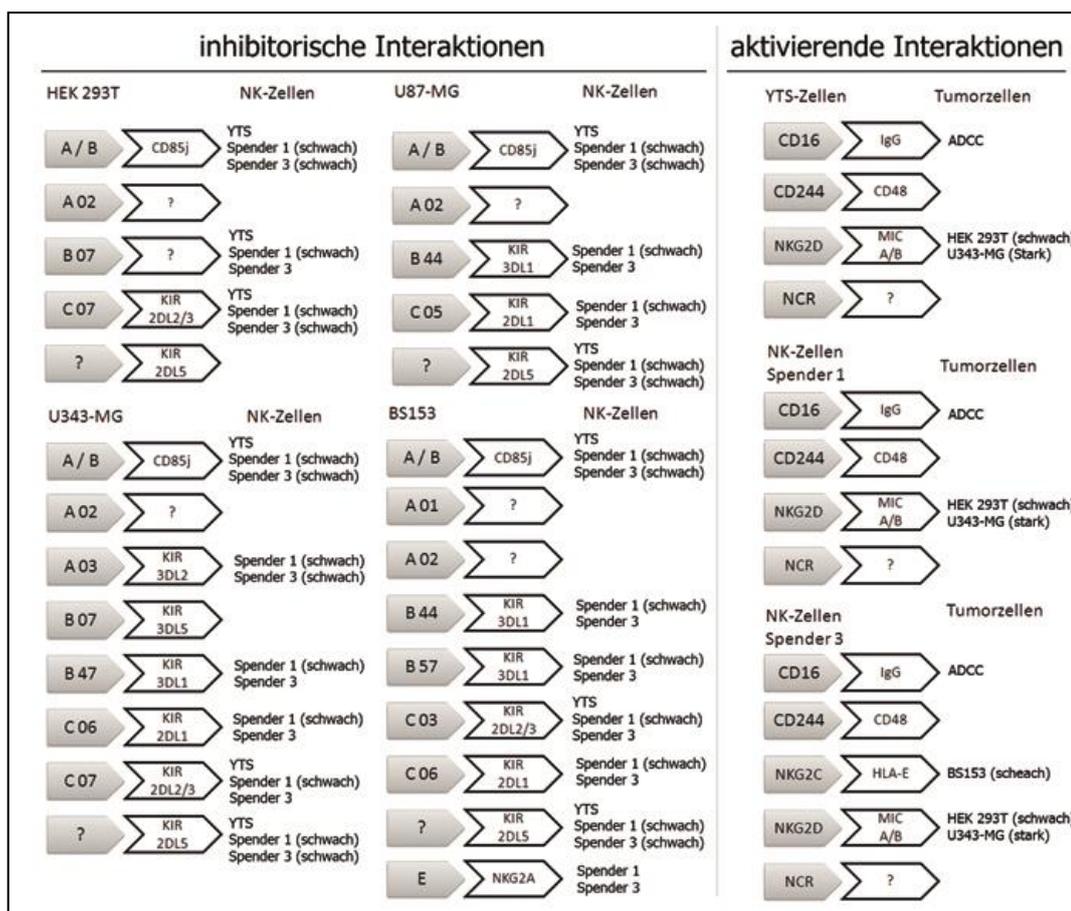


Abbildung 36 Überblick mögliche inhibitorische und aktivierende Interaktionen. Zusammenfassung der Ergebnisse von durchflusszytometrischer Analyse und HLA-Typisierung der eingesetzten Tumorzelllinien und YTS sowie NK-Zellen der Spender 1 und 3.

YTS-Zellen und primäre humane NK-Zellen exprimieren erwartungsgemäß typische NK-Zell-Marker und ein breites Repertoire an aktivierenden und inhibitorischen Rezeptoren. Anders als von der Strominger-Gruppe beschrieben (*Li2008*), konnte auch auf der NK-Zelllinie YTS der aktivierende Rezeptor NKG2D nachgewiesen werden. Doch vor allem in der KIR-Expression wird die genetische Variabilität der NK-Zellen deutlich. Die unterschiedlichen CAR-unabhängigen Interaktionen der NK-Zellen mit Tumorzellen in späteren Versuchen basieren auf dieser Rezeptorausstattung. Da aktivierende und inhibierende Signale in einer fein austarierten Balance zueinander stehen (*Cerwenka2001, Hallett2006, Lanier2008*) und außerdem nicht alle möglichen Marker untersucht wurden, können die hier gezogenen Schlüsse wahrscheinlich nicht jeden Effekt erklären, sondern nur einige Möglichkeiten wiedergeben. Bis auf K562 exprimieren alle Tumorzelllinien MHC Klasse I-Moleküle als Liganden für inhibitorische KIR auf ihrer Oberfläche. Damit sind sie prinzipiell vor einer „missing self“-Erkennung durch NK-Zellen geschützt (*Kärre1986, Moretta2004*). Der HLA-Status von HEK 293T ist nicht sehr divers, sie vermitteln demnach nur wenig inhibitorische Signale. Auch U87-MG besitzen nur wenige inhibitorische Liganden für die untersuchten KIR. U343-MG und BS153 hingegen präsentieren eine Vielzahl

inhibitorischer Liganden, um vor einer „missing self“-Erkennung durch NK-Zellen geschützt zu sein. Die durchflusszytometrischen Analysen erbrachten weitere zusätzliche Informationen. Alle eingesetzten Tumorzellen zeigen z. B. eine geringe FasL-Expression. Dies stellt einen häufig beschriebenen Mechanismus dar, angreifende Immunzellen zu umgehen (Töpfer2011). Gleichzeitig sind sie alle durch Expression von FasR und TRAIL-R2 zugänglich für apoptotische Signale. U343-MG zeigen zudem eine hohe Expression von MIC A/B. Diese Stressproteine werden durch den aktivierenden NK-Zellrezeptor NKG2D erkannt (Bauer1999) und können zu einer Aktivierung von NK-Zellen durch „induced self“ führen (Lanier2008, Bryceson2011). Schließlich tragen YTS-Zellen interessanterweise neben typischen NK-Zell-Markern auch CD28, ein kostimulatorisches Molekül in T-Zellen. Dieser Befund wird durch frühere Studien bestätigt (Azuma1992).

4.2 NACH GENTECHNISCHER VERÄNDERUNG EXPRIMIEREN DIE EINGESETZTEN TUMORZELLINIEN EGFRVIII UND SDF-1A

EGFRvIII wurde für diese Arbeit als Ziel einer Immuntherapie ausgewählt, da dieser onkogene Rezeptor ausschließlich auf malignen Zellen exprimiert wird (Wikstrand1998). Circa 30 - 40% aller primären Glioblastome sind EGFRvIII-positiv (Wong1987). Der Rezeptor vermittelt Zellen *in vivo* einen Proliferations- und Überlebensvorteil (Huang1997, Lal2002, Lammering2004, Sampson2010). Werden Glioblastom-Tumorproben in Kultur genommen, verlieren sie allerdings den EGFRvIII schon nach wenigen Passagen (Bigner1990, Pandita2004, Stockhausen2011). Im Vorfeld dieser Arbeit wurde Patientenmaterial auf EGFRvIII-Expression untersucht, dabei konnte keine Probe gefunden werden, die dauerhaft hohe Expressionsraten aufwies. Aus diesem Grund wurde die genetische Information zur Expression von EGFRvIII in die verwendeten Tumorzelllinien eingebracht, sofern sie – wie BS153-Zellen – nicht über eine intrinsische EGFRvIII-Expression verfügten. Die Überprüfung der Zielzelllinien mit Hilfe einer EGFRvIII-spezifischen PCR zeigt in Kapitel 3.3.1.1 auf mRNA-Ebene die gelungene Integration der fremden genetischen Information in deren DNA. Alle modifizierten Tumorzellen bildeten mRNA für EGFRvIII, während die parentalen Wildtypzellen nur mRNA für den Wildtyp EGFR besaßen. Ausgenommen davon sind BS153, die als relativ ursprüngliche primäre Glioblastomzelllinie auch als Wildtyp geringe Mengen des EGFRvIII exprimieren (Jones2001). Dessen Expression wird durch Kultivierung der Zellen mit dem EGFR-Inhibitor Erlotinib verstärkt und resultiert in der EGFRvIII-überexprimierenden Zelllinie BS153^{resE} (Schulte2013). Mit dem, wie in Abbildung 13 dargestellt, selbst generierten und aufgereinigten Einzelkettenantikörper scFv(MR1.1), der spezifisch EGFRvIII erkennt (Kuan2000), gelang in der durchflusszytometrischen Analyse der Nachweis von EGFRvIII auf der Oberfläche aller Tumorzelllinien (siehe Kapitel 3.3.1.2).

Eine weitere typische Eigenschaft von Glioblastomen ist die Sekretion des Chemokins SDF-1 α (Sehgal1998, Rempel2000, Bajetto2006). Daher diente eine durch SDF-1 α vermittelte Chemotaxis als zweites Ziel des zu etablierenden immuntherapeutischen Verfahrens. Zusätzlich zur EGFRvIII-Expression wurden U87-MG-Gliomzellen, die in späteren Tier-

versuchen genutzt werden sollten, genetisch so verändert, dass sie SDF-1 α in den Zellkulturüberstand sekretieren. Die dauerhafte Sekretion großer Mengen SDF-1 α wurde mittels ELISA nachgewiesen und die Ergebnisse in Kapitel 3.3.2 aufgeführt. Damit wurde gezeigt, dass die modifizierten U87-MG in der Lage sind, CXCR4-positive Effektorzellen chemotaktisch anzulocken. Ein in Kapitel 3.3.3 beschriebener klonaler Überlebensassay und Passagierung der Zellen in NMRI_{NuNu}-Nacktmäusen (siehe Kapitel 3.3.4) bestätigten zudem, dass derart modifizierte U87-MG keinen Überlebensnachteil davontragen und auch *in vivo* über lange Zeiträume vital und zur Proliferation befähigt bleiben. Schon geringe Zellzahlen (1.000 Zellen im klonalen Überlebensassay) reichen aus, um Klone zu generieren. Dies verdeutlicht die Tumorigenität und Aggressivität von Gliomzellen.

4.3 NK-ZELLEN EXPRIMIEREN NACH GENTECHNISCHER VERÄNDERUNG STABIL DEN CXCR4-CHEMOKINREZEPTOR UND EINEN EGFRVIII-SPEZIFISCHEN CHIMÄREN ANTIGENREZEPTOR

Es wurden, wie in Kapitel 3.2.2.2 dargestellt, neben dem CXCR4-Chemokinrezeptor chimäre Antigenrezeptoren entwickelt, die EGFRvIII als spezifisches tumorassoziiertes Antigen auf der Oberfläche von Gliomzellen erkennen. Nach Antigenbindung vermitteln sie über DAP12 ein aktivierendes Signal an NK-Zellen. Es existieren einige spezifische, gegen EGFRvIII gerichtete Einzelkettenantikörper (*Review siehe Wikstrand1998, Kuan2001*). Im Rahmen dieser Arbeit wurde der affinitätsgeriffte scFv(MR1.1) genutzt. Er ist eine ideale Grundlage für das Design eines CAR, da er im Vergleich zum parentalen Antikörper eine 15-fach erhöhte Bindungsaffinität besitzt. Dies bedeutet eine effiziente monovalente Antigenbindung des Einzelkettenantikörpers (*Kuan2000*).

Wichtig für die volle Funktionalität des CAR ist neben der Antigenbindestelle die Brückendomäne, die den Einzelkettenantikörper mit der Signaluntereinheit verknüpft. Sie vergrößert seinen Abstand zur Zellmembran und erleichtert eine effiziente Antigenbindung. Die Bedeutung der Brückendomäne für die Antigenbindung sowie stabile Expression und Funktion von chimären Antigenrezeptoren wurde mehrfach gezeigt (*Moritz1995, Patel1999*). Als Signaluntereinheit wurde in dieser Arbeit DAP12 gewählt, auch wenn andere Gruppen die CD3 ζ -Kette favorisieren (*Haynes2001*). Die Gruppe von Prof. Dr. Achim Temme ist die erste, die CAR für NK-Zellen mit DAP12 als Signaluntereinheit entwickelt hat. DAP12 ist Signalmolekül für aktivierende NK-Zellrezeptoren wie NKG2C, NKp44 und verschiedene KIR (*Lanier1998, Campbell2004, Carr2007*) und vermittelt ein starkes Signal für die Aktivierung der zytotoxischen Signalkaskade in NK-Zellen (*Lanier2008*). Es wurde bereits gezeigt, dass ein DAP12-basierter CAR für die NK-Zelllinie YTS ein stärkeres Aktivierungspotential als die CD3 ζ -Kette vermitteln kann (*Töpfer2014*). Weitere kostimulatorische Moleküle, die häufig in T-Zell-CAR inkludiert werden (u. a. CD28, 41-BB) (*Sadelain2009*), erscheinen daher für die volle Funktionalität des CAR nicht nötig. Um einen effektiven Transport des 50 kDa großen CAR-Proteins an die Zelloberfläche zu gewährleisten, wurde an die kodierende Sequenz der DNA 5'-seitig Igk als Leaderpeptid eingefügt. Igk vermittelt ein sekretorisches Signal, seine

Funktionalität für die Sekretion rekombinanter Immunglobuline wurde in mehreren Studien gezeigt (*Reavy2000, Beerens2008, Horynová2012*). Des Weiteren wurde berichtet, dass murines Igk nicht immunogen wirkt (*Horynova2012*). Es wird somit keine Bildung von humanen anti-Maus-Antikörpern als Reaktion auf CAR-modifizierte Zellen erwartet. Aufgrund des modularen Aufbaus der Rezeptorkonstrukte (siehe Abbildung 5 und 11) könnte, falls doch nötig, leicht humanes Igk eingefügt werden. Die hydrophobe Transmembrandomäne (TM) verhindert schließlich die Freisetzung des Proteins und verankert den CAR in der Zellmembran.

Die korrekte Translation der CAR in der NK-Zelllinie YTS wurde per Immunoblot-Analyse mit gegen den integrierten myc-Tag gerichteter Antikörper und DAP12-spezifischer Antikörper gezeigt (siehe Abbildung 17). Interessanterweise gelang der Nachweis aller chimären Rezeptorkonstrukte mit beiden Antikörpern bis auf Igk_MR1.1_DAP12^{mut}. Dieser CAR konnte mit dem eingesetzten DAP12-Antikörper von R&D nicht nachgewiesen werden. In Igk_MR1.1_DAP12^{mut} ist, wie in Abbildung 5 beschrieben, die ITAM-Region in der Signaluntereinheit mutiert. Durch Austausch der Tyrosin-Reste 91 und 102 mit Serin wurde das Epitop des monoklonalen Antikörpers zerstört (QGQRSDVYSDLNTQRPYYK laut Herstellerangaben) und dessen Bindung an DAP12^{mut} verhindert. Aussagen zum Dimerisationsverhalten können aufgrund des angewendeten eindimensionalen Blots in reduzierendem Milieu nicht getroffen werden. Um zu klären, ob chimäre Antigenrezeptoren Homodimere oder Heterodimere z. B. mit intrinsischem DAP12 bilden, müsste eine native 2D-Gelelektrophorese durchgeführt werden. Da nicht die Kinetik der Rezeptoren im Mittelpunkt der Untersuchung stand, sondern ihre Funktionalität, wurde darauf verzichtet.

In Kapitel 3.4.2.3 wird gezeigt, dass sowohl der CXCR4-Chemokinrezeptor als auch CAR auf der Oberfläche der YTS-Effektorzellen zugänglich für eine Antikörperfärbung waren und stabil und in großer Dichte exprimiert werden. Dies ist unabdingbar für die volle Funktionalität der so veränderten Immunzellen. Bereits 2006 wurde in einem klinischen Versuch zur Immuntherapie eines Ovarialkarzinoms darauf hingewiesen, dass die schlechte Oberflächenexpression eines CAR auf modifizierten Immunzellen deren tumorspezifische Effektivität stark eingrenzt (*Kershaw2006*). Eine Kotransduktion von YTS-Zellen mit Igk_MR1.1_DAP12 und CXCR4 gelang. Sowohl der CAR als auch der Chemokinrezeptor waren zeitgleich und mit ähnlichen Expressionsraten auf der Zelloberfläche nachweisbar. Dies befähigt YTS-Zellen, sowohl gerichtet hin zu einer SDF-1 α -Quelle zu migrieren, als auch EGFRvIII-positive Ziele zu erkennen.

Die Rezeptorkonstrukte wurden mittels lentiviralen Gentransfers auch in primäre humane NK-Zellen eingebracht. Hierfür wurden zunächst durch Ficoll-Gradientenzentrifugation und MACS-Technologie NK-Zellen aus dem Blut von drei gesunden Spendern isoliert (siehe Kapitel 2.5.1.2). Die Reinheit der isolierten Zellpopulation wurde durch CD56-Expression und fehlende CD3-Expression gezeigt (siehe Abbildung 19). Mehr als 90 % der Zellen waren

CD3-negativ und CD56-positiv und entsprachen damit dem typischen NK-Zell-Phänotyp (Cooper2001). Erfahrungsgemäß ist die Transduktion primärer Zellen sehr schwierig. Aus diesem Grund wurden zwei Transduktionsprotokolle getestet und vergleichend gegenübergestellt (siehe Tabelle 40). Mit dem sonst üblichen Protokoll, die Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit frischem polybrenversetzten Virusüberstand zu inkubieren, wurden keine hohen CAR-Expressionsraten erreicht. Daher wurde ein vor kurzem von Sutlu et al. beschriebenes Protokoll in abgewandelter Form genutzt. Es kombiniert eine Spintransduktion mit dem Einsatz von BX795, das den TBK1 / IKK ϵ – Komplex in der Signalkaskade des Toll-like-Rezeptors 3 inhibiert (Clark2009). So wird die Resistenz von NK-Zellen gegen virale Infektionen herabgesetzt (Sutlu2012). Zudem werden die NK-Zellen durch die Gabe von IL-2 zur Proliferation angeregt (Burns2003, Sutlu2009), während die Gabe von IL-21 ihre Ausreifung und Zytotoxizität fördert (Parrish-Novak2000, Brady2004). Die korrekte Translation der CAR wird durch die Immunoblot-Analyse in Kapitel 3.4.2.2 bewiesen. Die Überprüfung der Oberflächenexpression der CAR und des CXCR4-Chemokinrezeptors (siehe Kapitel 3.4.2.3) zeigt, dass nach Transduktion mit dem modifizierten Protokoll nach Sutlu et al. sowohl CXCR4 als auch die großen CAR stabil und in ausreichenden Mengen auf der Oberfläche der primären humanen NK-Zellen exprimiert werden. Wie in Tabelle 40 gezeigt, schwanken die Expressionsraten jedoch von Experiment zu Experiment, d. h. die Transduktionseffizienzen waren sehr unterschiedlich. Dies könnte verschiedene Ursachen haben, so z. B. variierende Qualitäten in der Virusproduktion, auch wenn der Virustiter bestimmt und die MOI bei Transduktionen stets über 30 lag. Auch die Vitalität der isolierten NK-Zellen oder der Gesundheitszustand der Spender können hierfür ausschlaggebend sein. Vor jedem NK-Zell-Experiment wurden daher Färbungen durchgeführt, um eine Expressionsrate der CAR von über 50 % zu gewährleisten. Anders als bei der NK-Zelllinie YTS gelang es in primären humanen NK-Zellen nicht, den CXCR4-Chemokinrezeptor und den Igc_MR1.1_DAP12 gemeinsam auf der Oberfläche der Zellen zu exprimieren. Der CXCR4-Chemokinrezeptor wurde zwar exprimiert, doch dies hemmte anscheinend die zeitgleiche Expression des CAR. Auch andere Gruppen, die primäre T-Zellen mit mehreren Konstrukten kotransduzieren wollten, berichten von ähnlichen Problemen (Craddock2010, Moon2011). Meist gelingt eine Koexpression nur in einem Bruchteil der Effektorzellen, was eine technische Limitation der zweifachen lentiviralen Transduktion darstellt. Hier besteht noch Optimierungsbedarf. Es könnte z. B. ein bicistronisches Expressionsplasmid entwickelt werden, das zwei Expressionskassetten trägt und für beide Rezeptoren zugleich kodiert. Allerdings wäre dieses Expressionsplasmid sehr groß, was eine effiziente Transduktion erschweren oder unmöglich machen würde. Da dieses Problem im Rahmen dieser Arbeit nicht gelöst werden konnte, wurden die Experimente mit kotransduzierten Zellen zunächst nur mit YTS-Zellen durchgeführt.

4.4 DER CXCR4-CHEMOKINREZEPTOR UND DER EGFRVIII-SPEZIFISCHE ANTIGENREZEPTOR SIND *IN VITRO* FUNKTIONELL

Nach der erfolgreichen Transduktion der Ziel- und Effektorzellen wurde deren Funktionalität in verschiedenen Experimenten überprüft. Das Migrationspotential von CXCR4-modifizierten YTS und primären humanen NK-Zellen wurde in einem Boyden-Kammer-Assay evaluiert. Die Migration in das untere Well mit SDF-1 α -haltigem Medium wurde, wie in Kapitel 3.5.1 gezeigt, durch die Expression von CXCR4 signifikant verbessert. Sowohl bei YTS als auch bei primären NK-Zellen wurden Steigerungen der Migration um mehr als ein Drittel erreicht. Die Abhängigkeit der Migration von der SDF-1 α / CXCR4-Achse konnte durch den Einsatz von AMD3100 bewiesen werden. Dieses Molekül ist als CXCR4-Inhibitor beschrieben (Schols1997). Um den Migrationsassay zu optimieren, hätten mit Matrigel oder einzelligem Endothel beschichtete Membranen eingesetzt werden können. Sie erfordern die Diapedese der Effektorzellen. Dies könnte in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Doch auch so wurde die Verbesserung der SDF-1 α -abhängigen Migration durch Transduktion von YTS- und NK-Zellen mit dem CXCR4-Chemokinrezeptor gezeigt. Erwähnenswert in diesem Zusammenhang ist, dass die Sekretion zu großer Mengen von SDF-1 α auch eine migrationshemmende Wirkung haben kann. Vianello et al. berichten bei SDF-1 α -Konzentrationen über 10 nM von einem chemo-repulsiven Effekt auf T-Zellen. Dies könnte ein weiterer Mechanismus der Immunevasion von Tumorzellen sein (Vianello2006). Experimente, welche die zur Anlockung von modifizierten NK-Zellen benötigten Konzentrationen von SDF-1 α austitrierten, wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Doch ergab die Passagierung der SDF-1 α -sekretierenden U87-MG in der Maus, dass im hier etablierten Testsystem die SDF-1 α - Sekretion *in vivo* beständig ist, aber die Konzentration über die Zeit abnimmt. Tabelle 39 zeigt, dass nach 21 Tagen in der Maus die Chemokinsekretion um knapp die Hälfte sinkt. Um sicherzugehen, dass kein chemorepulsiver Effekt auftritt, wurde die SDF-1 α -abhängige Migration *in vivo* überprüft, ehe mit der Immuntherapie etablierter Tumore begonnen wurde. Subkutan wurden SDF-1 α sekretierende Tumore in NMRI_{NuNu}-Nacktmäuse implantiert und über einen Zeitraum von 10 Tagen DsRed-markierte YTS wt und YTS CXCR4 intravenös verabreicht. Am Ende des Versuchszeitraums wurden die Tumore entnommen, Kryoschnitte angefertigt und die Zahl der eingewanderten YTS-Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Kapitel 3.6 beschrieben. In allen Fällen sammelten sich YTS an der Peripherie der Tumore, die durch den Blutstrom dorthin getragen worden waren. Sonst würde eine Therapie mit ausschließlich CAR-tragenden Immunzellen auch nicht funktionieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass CXCR4-positive YTS-Zellen stärker als Wildtyp-YTS in SDF-1 α -sekretierende Tumore einwandern. Dies ist auch dahingehend bemerkenswert, da U87-MG sehr kompakte Tumore mit festen Zellverbänden entwickeln, die CXCR4-positiven YTS also nur beschwerlich in die Zellzwischenräume migrieren können. Ein bedenkenswerter Aspekt ist, dass das Gehirn und speziell Glioblastom-Zellen nicht die einzigen Orte sind, die SDF-1 α sekretieren. Vor allem im Knochenmark wird ebenso SDF-1 α gebildet (Bleul1996). CXCR4-modifizierte NK-Zellen könnten also nicht nur zu Glioblastom-Nestern, sondern auch ins Knochenmark

einwandern, ein Nebeneffekt, der schwerlich vermeidbar ist. Doch vielleicht muss dies nicht unbedingt nachteilig sein. Zum einen stellt es eine Option für die Therapie anderer Krebsarten dar, die ins Knochenmark metastasieren. Zum anderen könnte es in dieser Nische zur Reifung langlebiger Memory-NK-Zellen kommen (*O'Leary2006, Sun2010, Paust2011, Fu2013*). Dieser Effekt sollte in weiteren Versuchen unbedingt evaluiert werden. Denn Memory-NK-Zellen könnten das Potential besitzen, langfristig SDF-1 α zu erkennen und durch dessen Sekretion an neu auftretende Gliomzell-Nester gelockt zu werden. Die Expression von MHC Klasse I auf normalen Körperzellen und die Nutzung von EGFRvIII als nur auf Tumorzellen exprimiertes Zielantigen für den CAR sollten dabei verhindern, dass modifizierte NK-Zellen unspezifisch auf gesundes Gewebe reagieren, falls sie nicht zum Tumor gelangen.

Die Aktivität der NK-Zellen wird durch ihre Expression von hochaffinen CAR und die Überexpression des EGFRvIII-Zielantigens auf Tumoren stark erhöht aber auch spezifiziert. Die Überprüfung dieser Hypothese wird in Kapitel 3.5.2.1 beschrieben. Bei der Kokultivierung von YTS-Zellen mit HEK 293T führt die Kreuzvernetzung des MR1.1_DAP12 mit EGFRvIII zur Phosphorylierung von ZAP70. Die densitometrische Auswertung des Immunoblots zeigte eine Verstärkung der Phosphorylierung um knapp das Doppelte im Vergleich zu den Kontrollen. Die ZAP70-Tyrosinkinase steht am Anfang der DAP12-vermittelten Signaltransduktionskaskade und induziert nach Phosphorylierung ein aktivierendes Signal (*Lanier2008*). In den als Negativkontrolle mitgeführten YTS Wildtypzellen bzw. YTS-Zellen, die mit Kontrollkonstrukten transduziert worden waren, wird die ZAP70-Kinase nicht verstärkt phosphoryliert. Das bedeutet, dass eine Quervernetzung allein nicht ausreichend ist, ein aktivierendes Signal zu vermitteln. Erst wenn das Antigen und funktionelles DAP12 vorhanden sind, kommt es zu einer Aktivierung zytotoxischer Signalwege.

Auch in primären humanen NK-Zellen führt der α -EGFRvIII-DAP12-CAR zu einer spezifischen Aktivierung. Nach Antigenbindung und Integration der aktivierenden und inhibitorischen Signale kommt es zur Degranulation von Perforin und Granzymen (*Smyth2005*) sowie zur Sekretion inflammatorischer Zytokine wie INF γ (*Smyth2001*). In einem weiteren Kokultivierungsexperiment wurde zur Untersuchung der Degranulation Monensin eingesetzt. Diese Substanz ist ein Ionophor, das die Struktur des Golgiapparates zerstört und somit den vesikulären Transport in eukaryotischen Zellen inhibiert (*Haney1967*). Damit können von den NK-Zellen keine Granula freigesetzt werden, der Degranulationsmarker CD107a sammelt sich an der Zelloberfläche und kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (*Alter2004*). Dies zeigt, dass primäre humane NK-Zellen nach Antigenerkennung über den CAR ihre Degranulation verstärken (siehe Kapitel 3.5.2.4). Die Sekretion signifikanter Mengen von INF γ in den Zellkulturüberstand in einem ähnlichen Kokultivierungsexperiment mit anschließendem INF γ -ELISA wird in Kapitel 3.5.2.5 gezeigt. Interessanterweise kann keine direkte Korrelation zwischen der Menge des sekretierten INF γ und der Antigenexpression auf den Zielzellen hergestellt werden. Dies widerspricht

einer Studie, die HER-2-spezifische NK-Zellen und deren INF γ -Sekretion untersucht (*Kruschinski2008*). In Relation zu den mit Ig κ _MR1.1_DAP12 transduzierten NK-Zellen vermittelten Wildtypzellen oder mit Kontrollkonstrukten transduzierte Zellen eine vergleichsweise geringe Aktivierung und auch EGFRvIII-negative Zielzellen führten zu keiner vermehrten Aktivierung von primären humanen NK-Zellen *in vitro*. Ursächlich für die beschriebene basale Hintergrundaktivierung der NK-Zellen könnten ein „HLA-mismatch“ (*Ruggeri1999, Ruggeri2002, Igarashi2004*) und die in Kapitel 4.1 diskutierte, verschiedenartige Expression von Oberflächenmolekülen auf den eingesetzten Zielzelllinien sein (*Cerwenka2001, Hallet2006, Lanier2008*). Dieser sogenannte „bystander-Effekt“ kann den NK-Zellen weitere inhibitorische oder aktivierende Signale vermitteln.

Chromfreisetzungs-Assays wurden zur Überprüfung der spezifischen, durch Immuneffektorzellen vermittelten Lyse von EGFRvIII-positiven Zielzellen eingesetzt (siehe Kapitel 3.5.2). Der Chromfreisetzungs-Assay mit YTS-Zellen war sehr spezifisch. Im in Abbildung 25 dargestellten Vorexperiment mit K562-Zellen wird gezeigt, dass YTS-Zellen, unabhängig von genetischen Modifikationen, diese HLA-negativen Zielzellen (*Lozzio1975*) erkennen und lysieren können. Das bedeutet, dass sie durch die lentivirale Transduktion nicht in ihren generellen zytotoxischen Eigenschaften gehemmt werden. Abbildung 26 fasst die Experimente mit EGFRvIII-positiven Zellen und den korrespondierenden Wildtypzellen zusammen. Es zeigte sich, dass YTS-Zellen, die mit dem α -EGFRvIII-DAP12-CAR modifiziert wurden, zu einer spezifischen Lyse von EGFRvIII-positiven Zielzellen befähigt sind. Bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 10:1 wurden 50 - 70 % der Zielzellen mit passendem Antigen lysiert. EGFRvIII-negative Tumorzellen wurden nicht lysiert. Erwartungsgemäß stellen BS153-Zellen eine Ausnahme dar, sie wurden aufgrund ihrer intrinsischen EGFRvIII-Expression (*Jones2001*) spezifisch lysiert. Dass U343-MG Wildtypzellen ebenso zu einem geringen Teil lysiert werden, ist allerdings überraschend. Der durchflusszytometrische Nachweis von EGFRvIII in Kapitel 3.3.1.2 ist nicht eindeutig. Eine leichte Färbung der Zellen scheint, ähnlich wie bei den parentalen BS153-Zellen, erkennbar. Doch in der EGFRvIII-spezifischen PCR konnte bei diesen Zellen keine EGFRvIII-mRNA nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.1.1). Dahingehend muss davon ausgegangen werden, dass der eingesetzte EGFRvIII-spezifische Antikörper scFv(MR1.1) ein anderes, dem PEPvIII-Peptid ähnliches Antigen auf der Oberfläche dieser Zellen bindet. Weiterhin könnten „bystander“-Effekte durch die erhöhte MIC-A/B-Expression bei U343-MG eine Rolle spielen (siehe Kapitel 3.1.1.1) und, wie in Kapitel 4.1 diskutiert, zur Aktivierung der YTS-Zellen über ihren NKG2D-Rezeptor führen (*Bauer1999*). Eine Aktivierung allein aufgrund der Expression von Stressproteinen und „induced self“-Erkennungsmechanismen (siehe Kapitel 1.3.2) führt aber nicht zu der beobachteten, anscheinend sehr spezifischen Lyse. Vielmehr würden alle YTS-Zellen (Wildtyp, Kontrollkonstrukte, funktioneller CAR) die U343-MG unspezifisch lysieren. Doch bei keiner der untersuchten Zielzelllinien vermittelte eines der eingesetzten Kontrollkonstrukte, weder DAP12 allein, noch der Ig κ _MR1.1_DAP12^{mut} mit defektem ITAM, eine Zytotoxizität, die über der Hintergrundlyse lag. Eine Kreuzvernetzung des

Igk_MR1.1_DAP12 auf der Oberfläche der Effektorzellen scheint also das beobachtete spezifische Aktivierungssignal für ihre zytotoxischen Effektormechanismen zu vermitteln. Wenn das „induced self“-Signal nicht ausreichend ist, um U343-MG Wildtypzellen durch NKG2D-abhängige Erkennungsmechanismen anzugreifen, könnte die Summierung mit einem weiteren, durch den CAR vermittelten Signal ausschlaggebend sein. Wird ein bestimmter „threshold“ an aktivierenden Signalen überschritten, würden so die NK-Zellen durch Kreuzvernetzung des CAR aktiviert und griffen U343-MG Wildtypzellen an. Expressieren genetisch modifizierte U343-MG dann zusätzlich EGFRvIII auf ihrer Oberfläche, aktivieren sie den α -EGFRvIII-DAP12-CAR noch stärker und induzieren eine hohe und spezifische Zytotoxizität der NK-Zellen über die Rekrutierung von DAP12-abhängigen aktivierenden Signalwegen.

Bei primären humanen NK-Zellen sind die in Kapitel 3.5.2.6 gezeigten Ergebnisse des Chromfreisetzung-Assays schwieriger zu interpretieren und der oben beschriebene „bystander“-Effekt noch deutlicher erkennbar. Aufgrund der Ergebnisse der Kokultivierung von YTS-Zellen mit U343-MG wurde hier auf diese Zielzellen verzichtet. Aufgrund der in Kapitel 4.1 diskutierten Interaktionen scheinen HEK 293T den NK-Zellen des Spenders 1 zu wenige inhibitorische Signale zu vermitteln. Die Wildtyp-Zellen wurden von den NK-Zellen des Spenders unspezifisch lysiert. Dieser Effekt könnte nur mit einem perfekten „match“ von Ziel- und Effektorzellen minimiert werden. Doch dies war, wie in Kapitel 4.1 erwähnt, nicht möglich. Das bedeutet, der Einfluss eines „HLA-mismatch“ und zusätzliche „bystander“-Effekte treten neben der spezifischen durch den CAR vermittelten Zytotoxizität auf und könnten unspezifische Nebeneffekte erklären. Die Zytotoxizität der NK-Zellen von Spender 1 gegenüber U87-MG und BS153-Zellen war spezifischer. Bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 20:1 wurden 65 - 90 % spezifische Lyse erreicht, wenn das EGFRvIII-Antigen präsentiert wurde. Fehlte es, fiel die Lyserate geringer aus. Die NK-Zellen des Spenders 3 lysierten alle drei EGFRvIII-positiven Zielzelllinien mit einer spezifischen Lyserate von 45 - 60 %. Da die Zielzellen anscheinend genügend inhibitorische Signale vermittelten, wurden nur geringe Hintergrundlysen beobachtet. Es zeigte sich aber, dass nur NK-Zellen, die mit einem nichtfunktionellen Konstrukt wie dem Igk_DAP12 transduziert wurden, eine sinnvolle Kontrolle für den Vergleich der Zytotoxizität darstellen. Untransduzierte NK-Wildtypzellen sind dem Anschein nach vitaler und reagieren daher unspezifischer als transduzierte NK-Zellen. Alles in allem wurde bei den Funktionalitäts-Assays die Schwierigkeit in der Arbeit mit primären humanen Zellen deutlich. Zwar gelang die Transduktion von primären NK-Zellen mit chimären Antigenrezeptoren oder Chemokinrezeptoren. Doch es bleibt die Herausforderung, primäre humane NK-Zellen in den großen Mengen zu gewinnen, wie sie für *in vivo*-Versuche benötigt werden. Nur wenige Gruppen arbeiten daher tatsächlich mit diesen Zellen (*Imai2005, Kruschinski2008, Pegram2008, Altvater2009, Li2010, Shimasaki2012*).

4.5 MIT DEM CHIMÄREN ANTIGENREZEPTOR ARMIERTE NK-ZELLEN VERRINGERN DAS WACHSTUM EGFRVIII-POSITIVER GLIOMZELLEN *IN VIVO*

Die Evaluation der entwickelten CAR *in vivo* wurde mit der NK-Zelllinie YTS durchgeführt. Passend zu den *in vitro*-Daten konnte ein starker antitumoraler Effekt des Igκ_MR1.1_DAP12 gezeigt werden. Dieser Effekt trat sowohl bei der in Kapitel 3.7.1 beschriebenen subkutanen Koinjektion von Tumorzellen und Effektorzellen als auch bei der Therapie von bereits etablierten subkutanen Tumoren in Kapitel 3.7.2 auf. Hier führte die für einen Zeitraum von 30 Tagen kontinuierliche systemische Applikation von YTS MR1.1_DAP12 zu einem signifikant verringerten Tumorwachstum verglichen mit Kontrollgruppen, die gar nicht, mit YTS Wildtypzellen oder Kontrollkonstrukte-tragenden YTS therapiert worden waren.

Trotz der statistisch signifikanten Tumorreaktivität der YTS MR1.1_DAP12 gab es in der Gruppe, die mit diesen Zellen behandelt wurden, immer wieder Mäuse, die nicht auf die Behandlung reagierten und große Tumore entwickelten. Die Ursachen dafür können vielfältig sein. Die angeimpften U87-MG^{EGFRvIII} wurden aus einer polyklonalen Zellpopulation entwickelt (*Nishikawa1994*). Das bedeutet, es gibt höchstwahrscheinlich Zellen, die weniger EGFRvIII als andere exprimieren. Da die CAR-modifizierten YTS-Zellen vor allem Zellen mit guter EGFRvIII-Oberflächenexpression angreifen, verschafft das fehlende tumorassoziierte Antigen diesen Tumorzellen so einen Überlebensvorteil. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass auch ursprünglich EGFRvIII-positive Tumorzellen nach einer Weile den EGFRvIII auf ihrer Oberfläche verlieren. Dieser „loss of antigen“ wurde bei subkutaner Passagierung in Mäusen ohne parallele Injektionen von NK-Zellen zwar nicht bemerkt (siehe Kapitel 3.3.4). Dennoch beobachten auch andere, dass Gliomzellen als Strategie der Immunevasion den EGFRvIII herunter regulieren können, wenn eine Immunreaktion nicht schnell und effizient erfolgt (*Sampson2010*). Um diesen EGFRvIII-Verlust ausschließen zu können, müssten in einem weiteren Versuch Tumore aus Mäusen, die nicht auf eine Behandlung mit YTS MR1.1_DAP12 reagierten, entnommen und auf Expression des EGFRvIII untersucht werden. Auch individuelle Unterschiede zwischen den Mäusen in einer Gruppe müssen in Betracht gezogen werden. Zwar besitzen NMRI_{NuNu}-Mäuse keinen Thymus und somit keine ausgereiften T-Zellen, dennoch verfügen sie über ein rudimentäres angeborenes Immunsystem (*Flanagan1966*). Dieses könnte z. B. in einer Host-versus-Graft-Reaktion injizierte humane NK-Zellen erkennen und in ihrer Effektorfunktion hemmen. Trotz einiger „non-responder“-Mäuse steigerte die Therapie mit YTS MR1.1_DAP12 die mittleren Überlebensraten der so behandelten Mäuse dennoch signifikant. Diese Ergebnisse zeigen, dass NK-Zellen, die mit dem funktionellen CAR armiert wurden, *in vivo* funktionell sind und zur spezifischen Lyse von EGFRvIII-positiven Gliomzellen befähigt sind.

4.6 MÖGLICHKEITEN ZUR OPTIMIERUNG DER EGFRVIII-SPEZIFISCHEN IMMUNTHERAPIE UND WEITERFÜHRENDE ARBEITEN

Ein nächster Schritt muss sein, die Untersuchungen auszuweiten, indem Patientenmaterial genutzt und Tumor-Xenografts orthotop ins Gehirn der Mäuse implantiert wird. Damit wären Glioblastom-spezifische Immunevasionsstrategien wie die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF β (*Schneider2006*) oder die Modulation des umgebenden Mikromilieus durch den Tumor besser darstellbar. Denkbar wäre z. B. die Kombination der CAR-Therapie mit dem Einsatz spezifischer TGF β -blockierender Antikörper (*Zhang2011*) oder die gentechnische Veränderung der zytotoxischen Effektorzellen selbst durch Blockade des TGF β -Rezeptors (*Foster2008, Yang2013*). Auch sollte überprüft werden, in wie weit eine Lymphodepletion vor dem adoptiven Zelltransfer von CAR-positiven Immunzellen die Eliminierung etablierter Tumore verbessert (*Wrzesinski2010, Sampson2014*). Ein bedenkenwerter Aspekt für weitere Forschungsarbeit ist die bereits beobachtete Immunevasionsstrategie etablierter Tumore, das von Immunzellen erkannte Antigen ins umgebende Milieu abzugeben („shedding“) oder dessen Expression herunter zu regulieren (*Töpfer2011*). Dieses Phänomen tritt auch bei EGFRvIII-positiven primären Glioblastomen auf (*Sampson2010*) und kann nur durch schnelle und effektive Lyse der betreffenden Tumorzellen durch die Immunzellen umgangen werden (*Ames2014*). Wie bereits erwähnt, bieten sich NK-Zellen auch hier an, da sie zum einen nicht nur durch den CAR mit zytotoxischem Potential ausgestattet sind, sondern weitere Erkennungsmechanismen für „missing self“, „induced self“ und „altered self“ besitzen (*Lanier2008, Bryceson2011*) und zum anderen auch Memory-Populationen ausbilden können (*O’Leary2006, Sun2010, Paust2011, Fu2013*). Da die Persistenz von adoptiv transferrierten NK-Zellen ausschlaggebend für eine effektive Tumoreliminierung ist, sollte eventuell in weiterführenden Experimenten getestet werden, ob diese weiter optimiert werden kann. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft, wie lange die gentechnisch veränderten Immunzellen in Mäusen überleben und in wie weit z. B. ein verändertes Expansionsprotokoll die Lebensdauer der NK-Zellen verlängern könnte. Eine vor kurzem von der Cerwenka-Gruppe veröffentlichte Studie mit Maus-NK-Zellen schlägt die Nutzung eines Zytokin-Mix aus IL-12, IL-15 und IL-18 vor. Sie zeigt, dass mit diesem Mix nicht nur höhere Expansionsraten generiert werden, sondern dass so behandelte NK-Zellen, ähnlich wie Memory-NK-Zellen, mehr als drei Monate im Organismus überleben und effektiv gegen Lymphome und Melanome vorgehen können (*Ni2012*).

Ein weiteres auftretendes methodisches Problem tritt bei der Nutzung von immundefizienten Mäusen wie dem Stamm NMRI_{NuNu} zutage. Dieses artifizielle Mausmodell kann durch sein beschädigtes Immunsystem (*Flanagan1966*) wichtige Effektormechanismen und Veränderungen des Tumormikromilieus nicht exakt abbilden. Aus diesem Grund waren dramatische Nebenwirkungen des adoptiven Transfers von CAR-modifizierten T-Zellen in frühen klinischen Studien nicht vorhersehbar (*Lamers2006, Morgan2010*). Es sind noch keine Mausmodelle mit spontan auftretendem Gliom beschrieben, daher würde zunächst ein syngeneses Gliommodell diese Limitationen umgehen. Die Rosenberg-Gruppe hat kürzlich

eine solche immunkompetente Modellmaus mit EGFRvIII-überexprimierenden Glioblastom-Zellen vorgestellt, die für die weitere Evaluation des Igκ_MR1.1_DAP12 in Erwägung gezogen werden könnte (*Sampson2014*).

4.7 NK-ZELLEN MIT KOMBINierter SDF-1A-CHEMOTAXIS UND REAKTIVITÄT GEGEN EGFRvIII-POSITIVE GLIOMZELLEN FÜHREN ZUR VERBESSERTEN TUMORELIMINIERUNG *IN VIVO*

Schlussendlich verbindet die vorliegende Arbeit die auf EGFRvIII umgelenkte Zytotoxizität mit einer verbesserten Migration, um die Hypothese der optimierten Immuntherapie durch Kombination dieser beiden Ansätze *in vivo* zu untersuchen. Andere Gruppen verfolgen ein ähnliches Konzept. Es ist bekannt, dass NK-Zellen, anders als T-Zellen, weniger gut in solide Tumore einwandern (*Kmieciak2014*) und dadurch daran gehindert werden, ihr volles intrinsisches zytotoxisches Potential zu entfalten. Einige Gruppen versuchen, die Chemokinsekretion von Tumorzellen zu erhöhen (*Dubinett2010*), andere entwickeln gentechnisch mit Chemokinrezeptoren ausgestattete Zellen (*Kershaw2002, Somanchi2012, Marcenaro2013*), um die Migration zum und in den Tumor zu erhöhen. Obwohl die Umlenkung von Immunzellen auf spezifische tumorassoziierte Antigene durch CAR häufig zu Erfolgen *in vitro* und in klinischen Studien führt, ist sie nicht in jedem Fall ausreichend für einen erfolgreichen Einsatz bei Krebspatienten. Ein wesentlicher Faktor ist, wie gut die Effektorzellen zum Tumor gelangen und in diesen einwandern können. Ob sie dort überleben, proliferieren und das immunsuppressive Milieu umgehen können, ist ausschlaggebend für die Entfaltung ihres vollen zytotoxischen Potentials. Ideal wäre daher eine Kombination von verbesserter Migration mit gelenkter Zytotoxizität.

Hierfür wurden, wie im Kapitel 3.7.3 beschrieben, U87-MG subkutan in NMRI_{NuNu}-Mäuse implantiert, die sowohl EGFRvIII exprimieren als auch SDF-1 α sekretieren. Die etablierten Tumore wurden systemisch durch intravenöse Injektion von kotransduzierten YTS-Zellen therapiert. Nach 45 Tagen war der Unterschied zwischen den Tumorgrößen der mit YTS MR1.1_DAP12 und YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 behandelten Mäuse nur knapp nicht signifikant. Zudem zeigte sich eine sehr große Varianz vor allem in der Gruppe, die mit YTS CXCR4 / MR1.1_DAP12 behandelt wurde. In einigen Mäusen kam es zu einer kompletten Tumorregression, andere schienen auf die Therapie kaum zu reagieren. Mögliche Ursachen für diese Beobachtung werden in Kapitel 4.5 diskutiert. Die Migrationsanalyse in Kapitel 3.6 hat dennoch gezeigt, dass CXCR4-positive YTS in der Lage sind, Tumorgewebe zu infiltrieren. Diese zusätzliche Migrationsoptimierung vermittelt Mäusen vor allem über einen längeren Zeitraum hinweg einen signifikanten Überlebensvorteil.

Einige exemplarische Studien mit T-Zellen kombinieren ebenso Migration und Zytotoxizität. Vorreiter mit ersten Migrationsstudien *in vitro* waren Kershaw et al., die IL-2 voraktivierte T-Zellen mit CXCR2 transduzierten, um sie in Richtung CXCL1-sekretierender Melanomzellen zu leiten (*Kershaw2002*). Basierend auf diesen Studien etablierten Craddock et al.

einen GD2-CAR und den Chemokinrezeptor CCR2b in T-Zellen, da sie in Proben von Patienten mit Neuroblastom zeigten, dass nach adoptivem Transfer von CAR-modifizierten T-Zellen nur wenige dieser Zellen am Tumor ankommen. Obwohl nach Transduktion nur 19 % der T-Zellen den CAR und den Chemokinrezeptor tatsächlich koexprimierten, konnten sie eine verbesserte Tumoreliminierung im Xenograft-Mausmodell zeigen (*Craddock2010*). Ebenso erfolgreich im Tiermodell war die Gruppe um Moon et al. Sie lenkten T-Zellen auf Mesothelin in Eierstockkrebs und Pankreaskrebs um und generierten zeitgleich über CCR2b eine gerichtete Migration hin zu CCL2 (*Moon2011*). In beiden Studien gelang, anders als im Rahmen dieser Arbeit, wo die gleichzeitige Expression von CAR und Chemokinrezeptor nicht zu einem statistisch signifikant verringerten Tumorwachstum führte, der Nachweis, dass chemokingeleitete T-Zellen etablierte Tumore sogar besser eliminieren als T-Zellen, die nur mit einem CAR transduziert worden waren. Sie zeigten auch, dass sich chemokingelenkte Zellen rasch im Tumorgewebe sammeln. Sie verbleiben anscheinend nicht in der Peripherie oder Leber und Milz, wo sie ihr Effektorpotential gar nicht entfalten, oder im schlimmsten Fall, unspezifisch gegen gesunde Körperzellen richten könnten. Weitere Studien mit anderen CAR und Chemokinrezeptoren kamen zu ähnlichen Ergebnissen (*Peng2010, diStasi2011, Asai2013*). Anders als bei ausschließlicher Migrationsoptimierung (*Somanchi2012, Marcenaro2013*) wurden bisher für derartige Kotransduktions-Experimente noch keine primären humanen NK-Zellen eingesetzt. Dies unterstreicht zum einen die auftretenden Schwierigkeiten mit diesen Zellen, zum anderen begründet es den Neuerungswert der vorliegenden Arbeit. Es konnte gezeigt werden, dass zytotoxische NK-Zellen, die mit einem CAR und einem Chemokinrezeptor ausgestattet wurden, über die Fähigkeit verfügen, *in vivo* ihr Zielantigen aufzuspüren und in Tumore einzuwandern. Dort entfalten sie ein spezifisch gegen dieses Antigen gerichtetes zytotoxisches Potential, ohne dass eine systemische Applikation von aktivierenden Zytokinen wie IL-2 mit potentiellen Nebenwirkungen nötig ist.

Mit dieser Arbeit verbindet sich die Hoffnung, einen Beitrag zu dem sich rasant entwickelnden Feld der NK-Zell-basierten Immuntherapie zu leisten. Weitere Forschungen werden die beschriebenen Schwierigkeiten adressieren und den Weg zu einer klinischen Adaption bereiten müssen. Dann könnten, auf den in dieser Arbeit beschriebenen grundlegenden Erkenntnissen basierend, gentechnisch veränderte NK-Zellen eingesetzt werden, im Patienten vor allem minimale Resterkrankungen oder bei Operationen nicht erfasste Tumorzellen aufzuspüren und zu eliminieren. Damit ergibt sich für die Zukunft ein wirkungsvoller Weg zur adjuvanten Therapie des primären Glioblastoms.

5 LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, N. (2005). Dynamics of CNS barriers: evolution, differentiation, and modulation. *Cell Mol Neurobiol* 25, 5–23.

Adams, S., Robbins, F., Chen, D., Wagage, D., Holbeck, S., Morse, H., Stroncek, D., and Marincola, F. (2005). HLA class I and II genotype of the NCI-60 cell lines. *J Transl Med*, 3:11. *J Transl Med* 3(1), 11.

Ahmed, N. (2010). NCT01109095: Administration of HER2 Chimeric Antigen Receptor Expressing CMV-Specific Cytotoxic T Cells Ins Patients With Glioblastoma Multiforme.

Alizadeh, D., Zhang, L., Brown, C., Farrukh, O., Jensen, M., and Badie, B. (2010). Induction of anti-glioma natural killer cell response following multiple low-dose intracerebral CpG therapy. *Clin Cancer Res* 16, 3399–3408.

Alter, G., Malenfant, J., and Altfeld, M. (2004). CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods* 294(1-2), 15–22.

Altvater, B. (2009). 2B4 (CD244) signaling by recombinant antigen specific chimeric receptors costimulates natural killer cell activation to leukemia and neuroblastoma cells. *Cancer Ther* 15(15), 4857–4866.

Ames, E., and Murphy, W. (2014). Advantages and clinical applications of natural killer cells in cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 63, 21–28.

Ames, E., Hallett, W., and Murphy, W. (2009). Sensitization of human breast cancer cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity by proteasome inhibition. *Clin Exp Immunol* 155, 504–513.

Antonyak, M., Moscatello, D., and Wong, A. (1998). Constitutive activation of c-Jun-N-terminal kinase by a mutant epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 2817–2822.

Aranda, F., Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Tartour, E., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013). Trial Watch. Peptide vaccines in cancer therapy. *Oncoimmunology* 2(12), e26621.

Asai, H., Fujiwara, H., An, J., Ochi, T., Miyazaki, Y., Nagai, K., Okamoto, S., Mineno, J., Kuzushima, K., Shiku, H., et al. (2013). Co-Introduced Functional CCR2 Potentiates In Vivo Anti-Lung Cancer Functionality Mediated by T Cells Double Gene-Modified to Express WT1-Specific T-Cell Receptor. *PLoSone* 8(2), e56820.

Avril, T., Vauleon, E., Hamlat, A., Saikali, S., Etcheverry, A., Delmas, C., Diabira, S., Mosser, J., and Quillien, V. (2012). Human glioblastoma stem-like cells are more sensitive to allogeneic NK and T cell mediated killing compared with serum-cultured glioblastoma cells. *Brain Pathol* 22(2), 159–174.

Azuma, M., Cayabyab, M., Buck, D., Phillips, J., and Lanier, L. (1992). Involvement of CD28 in MHC-unrestricted cytotoxicity mediated by a human natural killer leukemia cell line. *J Immunol* 149(4), 1115–1123.

- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565–568.
- Bajetto, A., Barbieri, F., Dorcaratto, A., Barbero, S., Daga, A., Porcile, C., Ravetti, J., and Zona, G. (2006). Expression of CXC chemokine receptors 1-5 and their ligands in human glioma tissues: Role of CXCR4 and SDF1 in glioma cell proliferation and migration. *Neurochem Int* 49, 423–432.
- Balabanian, K., Lagane, B., Infantino, S., Chow, K., Harriague, J., Moepps, B., Arenzana-Seisdedos, F., Thelen, M., and Bachelier, F. (2005). The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *J Biol Chem* 280, 35760–35766.
- Barao, I., and Murphy, W. (2003). The immunobiology of natural killer cells and bone marrow allograft rejection. *Biol Blood Marrow Transpl* 9(12), 727–741.
- Barker, C., and Billingham, R. (1977). Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 25, 1–54.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J., and Lanier, L. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–729.
- Beerens, A., Rots, M., Bermúdez, B., deVries, E., and Haisma, H. (2008). Secretion of thymidine kinase to increase the effectivity of suicide gene therapy results in the loss of enzymatic activity. *J Drug Targ* 16(1), 26–35.
- Bendall, L., Baraz, R., Juarez, J., Shen, W., and Bradstock, K. (2005). Defective p38 mitogen-activated protein kinase signaling impairs chemotactic but not proliferative responses to stromal-derived factor-1 α in acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Res* 65(8), 3290–3298.
- Berg, M., Lundqvist, A., McCoy, P.J., Samsel, L., Fan, Y., Tawab, A., and Childs, R. (2009). Clinical-grade ex vivo-expanded human natural killer cells up-regulate activating receptors and death receptor ligands and have enhanced cytolytic activity against tumor cells. *Cytotherapy* 11, 341–355.
- Bernardini, G., Sciume, G., Bosisio, D., Morrone, S., Sozzani, S., and Santoni, A. (2008). CCL3 and CXCL12 regulate trafficking of mouse bone marrow NK cell subsets. *Blood* 112, 3626–3634.
- Bigner, S., Humphrey, P., Wong, A., Vogelstein, B., Mark, J., Friedman, H., and Bigner, D. (1990). Characterization of the epidermal growth factor receptor in human glioma cell lines and xenografts. *Cancer Res* 50, 8017–8022.
- Bleul, C., Fuhlbrigge, R., Casasnovas, J., Aiuti, A., and Springer, T. (1996). A Highly Efficacious Lymphocyte Chemoattractant, Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 184(3), 1101–1109.
- Bögler, O., Huang, H., Kleihues, P., and Cavenee, W. (1995). The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15(3), 308–327.
- Boissel, L. (2009). Transfection with mRNA for CD19 specific chimeric antigen receptor restores NK cell mediated killing of CLL cells. *Leuk Res* 33(9), 1255–1259.

- Bonavia, R., Inda, M., Vandenberg, S., Cheng, S.-Y., Nagane, M., Hadwiger, P., Tan, P., Sah, D., Cavenee, W., and Furnari, F. (2011). EGFRvIII promotes glioma angiogenesis and growth through the NFκB interleukin-8 pathway. *Oncogene* 1–13.
- Boussif, Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B., and J P Behr (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(16), 7297–7301.
- Boyden, S. (1962). The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med* 115(3), 453–466.
- Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M., and Nutt, S. (2004). IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells. *J Immunol* 172, 2048–2058.
- Brentjens, R., Latouche, J., Santos, E., Marti, F., Gong, M., Lyddane, C., King, P., Larson, S., Weiss, M., Riviere, I., et al. (2003). Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes costimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med* 9(3), 279–286.
- Bryceson, Y., Chiang, S., Darmanin, S., Schlums, H., Theorell, J., and Wood, S. (2011). Molecular mechanisms of NK cell activation. *J Innate Immun* 68(21), 3479–3493.
- Burnet, F. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1–27.
- Burns, L., Weisdorf, D., deFor, T., Vesole, D., Repka, T., Blazar, B., Burger, S., Zhang, M., and Miller, J. (2003). IL-2-based immunotherapy after autologous transplantation for lymphoma and breast cancer induces immune activation and cytokine release: a phase I/II trial. *Bone Marrow Transpl* 32(2), 177–186.
- Campbell, K., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A., and Catina, T. (2004). NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence. *J Immunol* 172(2), 899–906.
- Carlotto, A., Hogsett, V., Maiorini, E., Razulis, J., and Sonis, S. (2013). The economic burden of toxicities associated with cancer treatment: review of the literature and analysis of nausea and vomiting, diarrhoea, oral mucositis and fatigue. *Pharmacoeconomics* 31, 753–766.
- Carr, W., Rosen, D., Arase, H., Nixon, D., Michaelsson, J., and Lanier, L. (2007). Cutting Edge: KIR3DS1, a gene implicated in resistance to progression of AIDS, encodes a DAP12-associated receptor expressed on NK cells that triggers NK cell activation. *J Immunol* 178(2), 647–651.
- Castriconi, R., Daga, A., Dondero, A., Zona, G., Poliani, P., Melotti, A., Griffiero, F., and Marubbi, D. (2009). NK cells recognize and kill human glioblastoma cells with stem cell-like properties. *J Immunol* 182(6), 3530–3539.
- Cerwenka, A., and Lanier, L. (2001). Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1(1), 41–49.

- Cheadle, E., Gilham, D., Thistlewaite, F., Radford, J., and Hawkins, R. (2005). Killing of non-Hodgkin lymphoma cells by autologous CD19 engineered T cells. *Br J Haematol* *129*(3), 322–332.
- Cheng, M., Chen, Y., Xiao, W., Sun, R., and Tian, Z. (2013). NK cell based immunotherapy for malignant diseases. *Cell Mol Immunol* *10*, 230–253.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* *162*(1), 156 – 159.
- Clark, K., Plater, L., Peggie, M., and Cohen, P. (2009). Use of the pharmacological inhibitor BX795 to study the regulation and physiological roles of TBK1 and IkappaB kinase epsilon: a distinct upstream kinase mediates Ser-172 phosphorylation and activation. *J Biol Chem* *284*(21), 14135–14146.
- Cooper, M., Fehninger, T., and Caligiuri, M. (2001). Biology of human natural killer cell subsets. *Trends Immunol* 633–640.
- Craddock, J., Lu, A., Bear, A., Pule, M., Brenner, M., Rooney, C., and Foster, A. (2010). Enhanced Tumor Trafficking of GD2 Chimeric Antigen Receptor T Cells by Expression of the Chemokine Receptor CCR2b. *J Immunother* *33*(8), 780–788.
- Curti, A., Ruggeri, L., d' Addio, A., Bontadini, A., Dan, E., Motta, M., Trabanelli, S., Guidice, V., and Urbani, E. (2011). Successful transfer of alloreactive haploidentical KIR ligand-mismatched natural killer cells after infusion in elderly high risk acute myeloid leukemia patients. *Blood* *118*(12), 3273–3279.
- Darken, M. (1964). Puromycin inhibition of protein synthesis. *Pharmacol Rev* *16*, 223–243.
- Davis, D., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G., Mandelboim, O., and Strominger, J. (1999). The human natural killer cell immune synapse. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 15062–15067.
- Davoust, N., Vuailat, C., Androdias, G., and Nataf, S. (2008). From bone marrow to microglia: barriers and avenues. *Trends Immunol* *29*(5), 227–234.
- Dirks, P., Patel, K., Hubbard, S., Ackerley, C., Hamel, P., and Rutka, J. (1997). Retinoic acid and the cyclin dependent kinase inhibitors synergistically alter proliferation and morphology of U343 astrocytoma cells. *Oncogene* *15*(17), 2037 – 2048.
- DiStasi, A., DeAngelis, B., Rooney, C., Zhang, L., Mahendravada, A., Foster, A., Heslop, H., Brenner, M., Dotti, G., and Savoldo, B. (2011). T lymphocytes coexpressing CCR4 and a chimeric antigen receptor targeting CD30 have improved homing and antitumor activity in a Hodgkin tumor model. *Blood* *113*, 6392–6402.
- DiTomaso, T., Mazzoleni, S., Wang, E., Sovena, G., Clavenna, D., and Franzin, A. (2010). Immunobiological characterization of cancer stem cells isolated from glioblastoma patients. *Clin Cancer Res* *16*(3), 800–813.
- Dubinett, S., Lee, J., Sharma, S., and Mule, J. (2010). Chemokines: Can Effector Cells be Re-directed to the Site of Tumor? *Cancer* *16*(4), 325–335.

- DuBridge, R., Tang, P., Hsia, H., Leong, P., Miller, J., and Calos, M. (1987). Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* *7*(1), 379 – 387.
- Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959). Plaque production by the polyoma virus. *Virology* *8*(3), 396 – 397.
- Dunn, G., Dunn, I., and Curry, W. (2007). Focus on TILs: prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in human glioma. *Cancer Immunol* *7*, 12–27.
- Ehrlich, P., and Bolduan, C. (1906). *Collected Studies on Immunology* (Wiley&Sons).
- Eshhar, Z. (2010). Adoptive cancer immunotherapy using genetically engineered designer T-cells: First steps into the clinic. *Curr Opin Mol Ther* *12*(1), 55–63.
- Esser, R., Müller, T., Stefes, D., Kloess, S., Seidel, D., Gillies, S., Aperlo-Iffland, C., Huston, J., Uherek, C., Schönfeld, K., et al. (2012). NK cells engineered to express a GD2-specific antigen receptor display built-in ADCC-like activity against tumour cells of neuroectodermal origin. *J Cell Mol Med* *16*(3), 569–581.
- Federspiel, B., Melhado, I., Duncan, A., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., and Jirik, F. (1993). Molecular cloning of the gene for a seven-transmembrane segment (7TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* *16*, 707–712.
- Feng, Y., Broder, C., Kennedy, P., and Berger, E. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* *272*, 872–877.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W., Moretta, A., and Münz, C. (2004). The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J Immunol* *172*(3), 1455–1462.
- Flanagan, S. (1966). “Nude”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Gen Res* *8*(3), 295–309.
- Forman, S. (2002). NCT00730613: Pilot Feasibility and Safety Study of Cellular Immunotherapy for Recurrent/Refractory Malignant Glioma Using Genetically-Modified Autologous CD8+ T Cell Clones.
- Foster, A., Heslop, H., Dotti, G., Lu, A., Khalil, M., and Brenner, M. (2008). Anti-tumor activity of EBV-specific T lymphocytes transduced with a dominant negative TGF-beta receptor. *J Immunother* *31*, 500–505.
- Franitza, S., Grabovsky, V., Wald, O., Weiss, I., Beider, K., Dagan, M., Darash-Yahana, M., Nagler, A., Brocke, S., Galun, E., et al. (2004). Differential usage of VLA-4 and CXCR4 by CD3+CD56+ NKT cells and CD56+CD16+ NK cells regulates their interaction with endothelial cells. *Eur J Immunol* *34*, 1333–1341.
- Friese, M., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., and Weller, M. (2004). RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* *64*(20), 7596–7603.

- Fu, X., Yang, B., Lao, S., Fan, Y., and Wu, C. (2013). Human memory-like NK cells migrating to tuberculous pleural fluid via IP-10/CXCR3 and SDF-1/CXCR4 axis produce IFN- γ in response to BCG. *Clin Immunol* 148(1), 113–123.
- GarciaDePalazzo, I., Adams, G., Sundareshan, P., Wong, A., Testa, J., Bigner, D., and Weiner, L. (1993). Expression of mutated epidermal growth factor receptor by non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res* 53(14), 3217–3220.
- Garg, A., Barnes, P., Porgador, A., Roy, S., Wu, S., Nanda, J., Griffith, D., Girard, W., Rawal, N., Shetty, S., et al. (2006). Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the NKp46 receptor. *J Immunol* 177(9), 6192–6198.
- Gattinoni, L., Powell, D., Rosenberg, S., and Restifo, N. (2006). Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* 6(5), 383–393.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195(4), 327–333.
- Ghiringhelli, F., Ménard, C., Martin, F., and Zitvogel, L. (2006). The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression. *Immunol Rev* 214(1), 229–238.
- Gleichmann, M., Gillen, C., Czardybon, M., Bosse, F., Greiner-Petter, R., Auer, J., and Müller, H. (2000). Cloning and characterization of SDF-1 γ , a novel SDF-1 chemokine transcript with developmentally regulated expression in the nervous system. *Eur J Neurosci* 12(6), 1857–1866.
- Graham, F., Smiley, J., Russell, W., and Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1), 59–74.
- Gritz, L., and Davies, J. (1983). Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 25(2-3), 179–188.
- Gullick, W. (1998). Type I growth factor receptors: current status and future work. *Biochem Soc Symp* 63, 193–198.
- Guyon, A., and Nahon, J.-L. (2007). Multiple actions of the chemokine stromal cell-derived factor-1 α on neuronal activity. *J Mol Endocrinol* 38, 365–376.
- Hallett, W., and Murphy, W. (2006). Positive and negative regulation of natural killer cells: therapeutic implications. *Semin Cancer Biol* 16, 367–382.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166(4), 557–580.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell* 100(1), 57–70.

- Haney, M.E.J., and Hoehn, M.M. (1967). Monensin, a new biologically active compound. I. Discovery and isolation. *Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)* 7, 349–452.
- Haynes, N., Snook, M., Trapani, J., Cerruti, L., Jane, S., Smyth, M., and Darcy, P. (2001). Redirecting mouse CTL against colon carcinoma superior signaling efficacy of single-chain variable domain chimeras containing TCR-zeta vs FcεRIγ. *J Immunol* 166(1), 182–187.
- Herberman, R., Nunn, M., and Lavrin, D. (1975). Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngenic acid allogenic tumors. *Int J Cancer* 16(2), 216–229.
- Hershkovitz, O., Rosental, B., and Rosenberg, L. (2009). Nkp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells. *J Immunol* 183(4), 2610–2621.
- Holmes, D., and Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114(1), 193–197.
- Hombach, A., Muche, J., Gerken, M., Gellrich, S., Heuser, C., Pohl, C., Sterry, W., and Abken, H. (2001). T cells engrafted with a recombinant anti-CD30 receptor target autologous CD30(+) cutaneous lymphoma cells. *Gene Ther* 8, 891–895.
- Hombach, A., Schlimper, C., Sievers, E., Frank, S., Schild, H., Sauerbruch, T., Schmidt-Wolf, I., and Abken, H. (2006). A recombinant anti-carcinoembryonic antigen immunoreceptor with combined CD3zeta-CD28 signalling targets T cells from colorectal cancer patients against their tumour cells. *Gut* 55, 1156–1164.
- Horynová, M., Takahashi, K., Hall, S., Renfrow, M., Novak, J., and Raska, M. (2012). Production of N-acetylgalactosaminyl-transferase 2 (GalNAc-T2) fused with secretory signal Igκ in insect cells. *Prot Expr Purif* 81(2), 175–180.
- Huang, H., Nagane, M., Klingbeil, C., Lin, H., Nishikawa, R., Ji, X., Huang, C., Gill, G., Wiley, H., and Cavenee, W. (1997). The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *J Biol Chem* 272(5), 2927–2935.
- Igarashi, T., Wynberg, J., Srinivasan, R., Becknell, B., McCoy, P.J., Takahashi, J., Suffredini, D., Linehan, W., Caligiuri, M., and Childs, R. (2004). Enhanced cytotoxicity of allogeneic NK cells with killer immunoglobulin-like receptor ligand incompatibility against melanoma and renal cell carcinoma cells. *Blood* 104(1), 170–177.
- Iliopoulou, E., Kountourakis, P., Karamouzis, M., Doufexis, D., Ardavanis, A., and Baxevanis, C. (2010). A phase I trial of adoptive transfer of allogeneic natural killer cells in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59(12), 1781–1789.
- Imai, C., Iwamoto, S., and Campana, D. (2005). Genetic modification of primary natural killer cells overcomes inhibitory signals and induces specific killing of leukemic cells. *Blood* 106(1), 376–383.

- Ishikawa, E., Tsuboi, K., Saijo, K., Harada, H., Takano, S., and Nose, T. (2004). Autologous natural killer cell therapy for human recurrent malignant glioma. *Anticancer Res* 24(3b), 1861–1872.
- Jewett, A., Tseng, H., Arasteh, A., Saadat, S., Christensen, R., and Cacalano, N. (2012). Natural killer cells preferentially target cancer stem cells; role of monocytes in protection against NK cell mediated lysis of cancer stem cells. *Curr Drug Deliv* 9(1), 5–16.
- Jiang, Z., Zhou, W., Guan, S., Wang, J., and Liang, Y. (2013). Contribution of SDF-1 /CXCR4 Signaling to Brain Development and Glioma Progression. *Neurosignals* 1, 240–258.
- Johnson, L., and Sampson, J. (2010). Immunotherapy Approaches for Malignant Glioma from 2007 to 2009. *Curr Neuro Neurosci Rep* 10(4), 259–266.
- Jones, G., Machado, J.J., and Merlo, A. (2001). Loss of focal adhesion kinase (FAK) inhibits epidermal growth factor receptor-dependent migration and induces aggregation of NH(2)-terminal FAK in the nuclei of apoptotic glioblastoma cells. *Cancer Res* 61(13), 4978–4981.
- Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E., and Raulet, D. (2012). RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med* 209(13), 2409–2422.
- Kahlon, K., Brown, C., Cooper, L., Raubitschek, A., Forman, S., and Jensen, M. (2004). Specific recognition and killing of glioblastoma multiforme by interleukin-13-zetakine redirected cytolytic T cells. *Cancer Res* 64(24), 9160–9166.
- Kärre, K., Ljunggren, H., Piontek, G., and Kiessling, R. (1986). Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature* 319.
- Keizer, R., Huitema, A., Schellens, J., and Beijnen, J. (2010). Clinical Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *Clin Pharmacol* 49(8), 493–507.
- Kershaw, M., Wang, G., and Westwood, J. (2002). Redirecting migration of T cells to chemokine secreted from tumors by genetic modification with CXCR2. *Human Gene Ther* 13, 1971–1980.
- Kershaw, M., Jackson, J., Haynes, N., Teng, M., Moeller, M., Hayakawa, Y., Street, S., Cameron, R., Tanner, J., Trapani, J., et al. (2004). Gene-engineered T cell as a superior adjuvant therapy for metastatic cancer. *J Immunol* 173(3), 2143–2150.
- Kershaw, M., Westwood, J., Parker, L., Wang, G., Eshhar, Z., Mavroukakis, S., White, D., Wunderlich, J., Canevari, S., Rogers-Freezer, L., et al. (2006). A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 12, 6106–6115.
- Kiessling, R., Klein, E., and Wigzell, H. (1975). “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* 5(2), 112–117.

Kita, D., Yonekawa, Y., Weller, M., and Ohgaki, H. (2007). PI3KCA alterations in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* *113*(3), 295–302.

Kmieciak, J., Zimmer, J., and Chekenya, M. (2014). Natural killer cells in intracranial neoplasms: presence and therapeutic efficacy against brain tumours. *J Neurooncol* *116*(1), 1–9.

Kochenderfer, J., Dudley, M., Feldman, S., Wilson, W., Spaner, D., Maric, I., Stetler-Stevenson, M., Phan, G., Hughes, M., Sherry, R., et al. (2012). B-cell depletion and remissions in malignancy along with cytokine-associated toxicity in a clinical trial of anti-CD19 chimeric-antigen-receptor-transduced T cells. *Blood* *119*(12), 2709–2720.

Kong, S., Sengupta, S., Tyler, B., Bais, A., Ma, Q., Doucette, S., Zhou, J., Sahin, A., Carter, B., Brem, H., et al. (2012). Suppression of human glioma xenografts with second-generation IL13R-specific chimeric antigen receptor-modified T cells. *Clin Cancer Res* *18*, 5949–5960.

Konsman, J., Drukarch, B., and vanDam, A. (2007). (Peri)vascular production and action of pro-inflammatory cytokines in brain pathology. *Clin Sci* *112*(1), 1–25.

Krause, S., Gastpar, R., Andreesen, R., Gross, C., Ullrich, H., Thonigs, G., Pfister, K., and Multhoff, G. (2004). Treatment of colon and lung cancer patients with ex vivo heat shock protein 70-peptide-activated, autologous natural killer cells: a clinical phase I trial. *Clin Cancer Res* *10*(11), 3699–3707.

Kruschinski, A., Moosmann, A., Poschke, I., Norell, H., Chmielewski, M., Seliger, B., Kiessling, R., Blankenstein, T., Abken, H., and Charo, J. (2008). Engineering antigen-specific primary human NK cells against HER-2 positive carcinomas. *Proc Natl Acad Sci USA* *105*(45), 17481–17488.

Kuan, C., Wikstrand, C., Archer, G., Beers, R., Pastan, I., Zalutsky, M., and Bigner, D. (2000). Increased binding affinity enhances targeting of glioma xenografts by EGFRvIII-specific scFv. *Int J Cancer* *88*(6), 962–969.

Kuan, C., Wikstrand, C., and Bigner, D. (2001). EGF mutant receptor vIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* *8*(2), 83–96.

Lacalle, R., Pulido, D., Vara, J., Zalacaín, M., and Jiménez, A. (1989). Molecular analysis of the pac gene encoding a puromycin N-acetyl transferase from *Streptomyces alboniger*. *Gene* *79*(2), 375–380.

Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*(5259), 680–685.

Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., et al. (2009). NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J Clin Invest* *119*(5), 1251–1263.

Lal, A., Glazer, C., Martinson, H., Friedman, H., Archer, G., Sampson, J., and Riggins, G. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor up-regulates molecular effectors of tumor invasion. *Cancer Res* *62*(12), 3335–3339.

- Lamers, C., Sleijfer, S., Vulto, A., Kruit, W., Kliffen, M., Debets, R., Gratama, J., Stoter, G., and Oosterwijk, E. (2006). Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol* 24(13), e20–22.
- Lammering, G., Hewit, T., Holmes, M., Valerie, K., Hawkins, W., Lin, P., Mikkelsen, R., and Schmidt-Ullrich, R. (2004). Inhibition of the type III epidermal growth factor receptor variant mutant receptor by dominant-negative EGFR-CD533 enhances malignant glioma cell radiosensitivity. *Clin Cancer Res* 10(19), 6732–6743.
- Lanier, L. (2008). Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* 9(5), 495–502.
- Lanier, L. (2009). DAP10- and DAP12-associated receptors in innate immunity. *Immunol Rev* 227(1), 150–160.
- Lanier, L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8(6), 693–701.
- Lee, B., Lee, T., Avraham, S., and Avraham, H. (2004). Involvement of the Chemokine Receptor CXCR4 and Its Ligand Stromal Cell-Derived Factor 1A in Breast Cancer Cell Migration Through Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Mol Cancer Res* 2(6), 327–338.
- Li, C., Ge, B., Nicotra, M., Stern, J., Kopcow, H., Chen, X., and Strominger, J. (2008). JNK MAP kinase activation is required for MTOC and granule polarization in NKG2D-mediated NK cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(8), 3017–3022.
- Li, L., Liu, L., Feller, S., Allen, C., Shivakumar, R., Fratantoni, J., Wolfraim, L., Fujisaki, H., Campana, D., Chopas, N., et al. (2010). Expression of chimeric antigen receptors in natural killer cells with a regulatory compliant non viral method. *Cancer Gene Ther* 17(3), 147–.
- Lindencrona, J., Preiss, S., Kammertoens, T., Schuler, T., Piechocki, M., Wei, W., Seliger, B., Blankenstein, T., and Kiessling, R. (2004). CD4+ T cell-mediated HER-2/neu-specific tumor rejection in the absence of B cells. *Int J Cancer* 109, 259–264.
- Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *J Biol Chem* 269(1), 232–237.
- Lorimer, I., Keppler-Hafkemeyer, A., Beers, R., Pegram, C., Bigner, D., and Pastan, I. (1996). Recombinant immunotoxins specific for a mutant epidermal growth factor receptor: targeting with a single chain antibody variable domain isolated by phage display. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25), 15815–14820.
- Louis, D., Ohgaki, H., Wiestler, O., Cavenee, W., Burger, P., Jouvet, A., Scheithauer, B., and Kleihues, P. (2007). The WHO classification of tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* 114(2), 97–109.

- Lozzio, C., and Lozzio, B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45(3), 321–334.
- Maher, J., Brentjens, R., Gunset, G., Riviere, I., and Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCR/CD28 receptor. *Nat Biotechnol* 20(1), 70–75.
- Malmberg, K., Beziat, V., and Ljunggren, H. (2012). Spotlight on NKG2C and the human NK-cell response to CMV infection. *Eur J Immunol* 42(12), 3131–3145.
- Marcenaro, E., Pesce, S., Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., and Moretta, A. (2013). KIR2DS1-dependent acquisition of CCR7 and migratory properties by human NK cells interacting with allogenic HLA-C2+ DCs or T cell blasts. *Blood* 121, 3396–3401.
- Mellinghoff, I., Wang, M., Vivanco, I., Haas-Kogan, D., Zhu, S., Dia, E., Lu, K., Yoshimoto, K., Huang, H., Chute, D., et al. (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353(19), 2012–2024.
- Meropol, N., Porter, M., Blumenson, L., Lindemann, M., Perez, R., Vaickus, L., Loewen, G., Creaven, P., Wilkes, K., Giedlin, M., et al. (1996). Daily subcutaneous injection of low-dose interleukin 2 expands natural killer cells in vivo without significant toxicity. *Clin Cancer Res* 2(4), 669–677.
- Moon, E., Carpenito, C., and Sun, J. (2011). Expression of a Functional CCR2 Receptor Enhances Tumor Localization and Tumor Eradication by Retargeted Human T cells Expressing a Mesothelin-Specific Chimeric Antibody Receptor. *Clin Cancer Res* 17, 4719–4730.
- Morandi, B., Bougras, G., Muller, W., Ferlazzo, G., and Münz, C. (2006). NK cells of human secondary lymphoid tissues enhance T cell polarization via IFN-gamma secretion. *Eur J Immunol* 36(9), 2394–2400.
- Moretta, L., and Moretta, A. (2004). Unravelling natural killer cell function: triggering and inhibitory human NK receptors. *EMBO J* 23, 255–259.
- Morgan, R., Yang, J., Kitano, M., Dudley, M., Laurencot, C., and Rosenberg, S. (2010). Case report of a serious adverse event following the administration of T cells transduced with a chimeric antigen receptor recognizing ErbB2. *Mol Ther* 18, 854–851.
- Morgan, R., Johnson, L., Davies, J., Zheng, Z., Woolard, K., Reap, E., Feldman, S., Chinnasamy, N., Kuan, C., Song, H., et al. (2012). Recognition of Glioma Stem Cells by Genetically Modified T Cells Targeting EGFRvIII and Development of Adoptive Cell Therapy for Glioma. *Human Gene Ther* 23, 1043–1053.
- Moritz, D., and Groner, B. (1995). A spacer region between the single chain antibody- and the CD3 zeta-chain domain of chimeric T cell receptor components is required for efficient ligand binding and signaling activity. *Gene Ther* 2, 539–546.
- Moscattello, D., Holgado-Madruga, M., Godwin, A., Ramirez, G., Gunn, G., Zoltick, P., Biegel, J., Hayes, R., and Wong, A. (1995). Frequent expression of a mutant epidermal growth factor receptor in multiple human tumors. *Cancer Res* (23), 5536–5539.

- Müller, T., Uherek, C., Maki, G., Chow, K., Schimpf, A., Klingemann, H., Tonn, T., and Wels, W. (2008). Expression of a CD20-specific chimeric antigen receptor enhances cytotoxic activity of NK cells and overcomes NK-resistance of lymphoma and leukemia cells. *Cancer Immunol Immunother* 57(3), 411–423.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51(1), 263–273.
- Nagasawa, T., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1994). Molecular cloning and structure of a pre-B-cell growth-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(6), 2305–2309.
- Nagasawa, T., Nakajima, T., Tachibana, K., Iizasa, H., Bleul, C., Yoshie, O., Matsushima, K., Yoshida, N., Springer, T., and Kishimoto, T. (1996). Molecular cloning and characterization of a murine pre-B-cell growth-stimulating factor/stromal cell-derived factor 1 receptor, a murine homolog of the human immunodeficiency virus 1 entry coreceptor fusin. *Proc Natl Acad Sci USA* 93(25), 14726–14729.
- Narita, Y., Nagane, M., Mishima, K., Huang, H., Furnari, F., and Cavenee, W. (2002). Mutant epidermal growth factor receptor signaling down-regulates p27 through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in glioblastomas. *Cancer Res* 62(22), 6764–6769.
- Ni, J., Miller, M., Stojanovic, A., Garbi, N., and Cerwenka, A. (2012). Sustained effector function of IL-12/15/18-preactivated NK cells against established tumors. *J Exp Med* 209(13), 2351–2365.
- Nishikawa, R., Ji, X., Harmon, R., Lazar, C., Gill, G., Cavenee, W., and Huang, H. (1994). A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(16), 7727–7731.
- Noda, M., Omatsu, Y., Sugiyama, T., Oishi, S., Fuji, N., and Nagasawa, T. (2011). CXCL12-CXCR4 chemokine signaling is essential for NK cell development in adult mice. *Blood* 117(2), 451–458.
- O’Leary, J., Goodarzi, M., Drayton, D., and vonAndrian, U. (2006). T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells. *Nat Immunol* 7, 507–516.
- Oberoi, P., Jabulowsky, R., Bähr-Mahmud, H., and Wels, W. (2013). EGFR-targeted Granzyme B expressed in NK cells enhances natural cytotoxicity and mediates specific killing of tumor cells. *PLoSone* 8(4), e61267.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2013). The Definition of Primary and Secondary Glioblastoma. *Clin Cancer Res* 19, 764–772.
- Ohgaki, H., Dessen, P., Jourde, B., Horstmann, S., Nishikawa, T., DiPatre, P., Burkhard, C., Schuler, D., Probst-Hensch, N., Maiorka, P., et al. (2004). Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study. *Cancer Res* 64(19), 6892–6899.
- Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S., and Miyazaki, S. (1996). Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol* 157, 2909–2915.

- Pandita, A., Adalpe, K., Zadeh, G., Guha, A., and James, C. (2004). Contrasting in vivo and in vitro fates of glioblastoma cell subpopulations with amplified EGFR. *Gen Chrom Canc* 39, 29–36.
- Pardo, J., Malpartida, F., Rico, M., and Jiménez, A. (1985). Biochemical basis of resistance to hygromycin B in *Streptomyces hygroscopicus*-the producing organism. *J Gen Microbiol* 131(6), 1289–1298.
- Parkhurst, M., Riley, J., Dudley, M., and Rosenberg, S. (2011). Adoptive transfer of autologous natural killer cells leads to high levels of circulating natural killer cells but does not mediate tumor regression. *Clin Cancer Res* 17(19), 6287–6297.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, J., Gross, J., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., and West, J. (2000). Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function. *Nature* 408, 57–63.
- Patel, S., Moskalenko, M., Smith, D., Maske, B., Finer, M., and McArthur, J. (1999). Impact of chimeric immune receptor extracellular protein domains on T cell function. *Gene Ther* 6, 412–419.
- Paust, S., and vonAndrian, U. (2011). Natural killer cell memory. *Nat Immunol* 12(6), 500–508.
- Pegram, H., Jackson, J., Smyth, M., Kershaw, M., and Darcy, P. (2008). Adoptive transfer of gene-modified primary NK cells can specifically inhibit tumor progression in vivo. *J Immunol* 181(5), 3449–3455.
- Peiffer, J., and Kleihues, P. (1999). Hans-Joachim Scherer (1906-1945), pioneer in glioma research. *Brain Pathol* 9, 241–245.
- Peng, W., Ye, Y., Rabinovich, B., Liu, C., Lou, Y., and Zhang, M. (2010). Transduction of tumor-specific T-cells with CXCR2 chemokine receptor improves migration to tumor and antitumor immune responses. *Clin Cancer Res* 16, 5458–5468.
- Pinthus, J., Waks, T., Malina, V., Kaufman-Francis, K., Harmelin, A., Aizenberg, I., Kanety, H., Ramon, J., and Eshhar, Z. (2004). Adoptive immunotherapy of prostate cancer bone lesions using redirected effector lymphocytes. *J Clin Invest* 114(12), 1774–1781.
- Plautz, G., Miller, D., Barnett, G., Stevens, G., Maffett, S., Kim, J., Cohen, P., and Shu, S. (2000). T cell adoptive immunotherapy of newly diagnosed gliomas. *Cancer Res* 60(6), 2209–2218.
- Poli, A., Wang, J., Domingues, O., Planaguma, J., Yan, T., Rygh, C., Skaftnesmo, K., and Thorsen, F. (2013). Targeting glioblastoma with NK cells and mAb against NG2/CSPG4 prolongs animal survival. *Oncotarget* 4(9), 1507–1526.
- Ponten, J., and Macintyre, E. (1968). Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* 74(4), 465 – 486.
- Porter, D., Levine, B., Kalos, M., Bagg, A., and June, C. (2011). Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells in Chronic Lymphoid Leukemia. *N Engl J Med* 365(8), 725–733.

- Prigent, S., Nagane, M., Lin, H., Huvar, I., Boss, G., Feramisco, J., Cavenee, W., and Huang, H. (1996). Enhanced tumorigenic behaviour of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway. *J Biol Chem* *271*(41), 25639–25645.
- Prins, R., Vo, D., Khan-Farooqi, H., Yang, M., Soto, H., Economou, J., Liau, L., and Ribas, A. (2006). NK and CD4 cell collaborate to protect against melanoma tumor formation in the brain. *J Immunol* *177*(12), 8448–8455.
- Pule, M., Savoldo, B., Myers, G., Rossig, C., Russell, H., Dotti, G., Huls, M., Liu, E., Gee, A., Mei, Z., et al. (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* *14*(11), 1264–1270.
- Rasheed, S., Nelson-Rees, W., Toth, E., Arnstein, P., and Gardner, M. (1974). Characterization of a newly derived human sarcoma cell line (HT-1080). *Cancer* *33*(4), 1027–1033.
- Reavy, B., Ziegler, A., Diplexcito, J., Macintosh, S., Torrance, L., and Mayo, M. (2000). Expression of functional recombinant antibody molecules in insect cell expression systems. *Prot Expr Purif* *18*(2), 221–228.
- Rempel, S., Dudas, S., Ge, S., and Gutierrez, J. (2000). Identification and Localization of the Cytokine SDF1 and Its Receptor, CXCR4, to Regions of Necrosis and Angiogenesis in Human Glioblastoma. *Clin Cancer Res* *6*(1), 102–111.
- Restifo, N., Dudley, M., and Rosenberg, S. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol* *12*, 269–281.
- Rizzieri, D., Storms, R., Chen, D., Long, G., Yang, Y., and Nikcevic, D. (2010). Natural killer cell-enriched donor lymphocyte infusions from a 3-6/6 HLA matched family member following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transpl* *16*(8), 1107–1114.
- Rosenberg, S. (2011). NCT01454596: A Phase I/II Study of the Safety and Feasibility of Administering T Cells Expressing Anti-EGFRvIII Chimeric Antigen Receptor to Patients With Malignant Gliomas Expressing EGFRvIII.
- Rosenberg, S., Spiess, P., and Lafreniere, R. (1986). A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* *233*(4770), 1318–1321.
- Rosenberg, S., Yang, J., and Restifo, N. (2004). Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* *10*(9), 909–915.
- Ruggeri, L., Capanni, M., Casucci, M., Volpi, I., Tosti, A., Perruccio, K., Urbani, E., Negrin, R., Martelli, M., and Velardi, A. (1999). Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* *94*(1), 333–339.

- Ruggeri, L., Capanni, M., Urbani, E., Perruccio, K., Shlomchik, W., Tosti, A., Posati, S., Rogaia, D., Frassoni, F., and Aversa, F. (2002). Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science* *295*, 2097–2100.
- Sadelain, M., Brentjens, R., and Riviere, I. (2009). The promise and the potential pitfalls of chimeric antigen receptors. *Curr Opin Immunol* *21*, 215–223.
- Saini, V., Marchese, A., and Majetschak, M. (2010). CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin. *J Biol Chem* *285*(20), 15566–15576.
- Salmaggi, A., Gelati, M., Pollo, B., Marras, C., Silvani, A., Balestrini, M., Eoli, M., Fariselli, L., Broggi, G., and Boiardi, A. (2005). CXCL12 expression is predictive of a shorter time to tumor progression in low-grade glioma. A single-institution study in 50 patients. *J Neurooncol* *74*(3), 287–293.
- Sampson, J., Heimberger, A., Archer, G., Adalpe, K., Friedman, A., Friedman, H., Gilbert, M., Herndon, J., McLendon, R., Mitchell, D., et al. (2010). Immunologic escape after prolonged progression-free survival with epidermal growth factor receptor variant III peptide vaccination in patients with newly diagnosed glioblastoma. *J Clin Oncol* *28*(31), 4722–4729.
- Sampson, J., Choi, B., Sanchez-Perez, L., Suryadevara, C., Snyder, D., Flores, C., Nair, S., Schmittling, R., Reap, E., Norberg, P., et al. (2014). EGFRvIII mCAR-modified T cell therapy cures mice with established intracerebral glioma and generates host immunity against tumor-antigen loss. *Clin Cancer Res* *20*(4), 972–984.
- Sanger, F., and Coulson, A. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* *94*(3), 441–448.
- Sasaki, M., Knobbe, C., Itsumi, M., Elia, A., Harris, I., Chio, I., Cairns, R., McCracken, S., Wakeham, A., Haight, J., et al. (2012). D-2-hydroxyglutarate produced by mutant IDH1 perturbs collagen maturation and basement membrane function. *Genes Dev* *26*(18), 2038–2049.
- Schirrmann, T., and Pecher, G. (2002). Human natural killer cell line modified with a chimeric immunoglobulin T cell receptor gene leads to tumor growth inhibition in vivo. *Cancer Gene Ther* *9*(4), 390–398.
- Schirrmann, T., and Pecher, G. (2005). Specific targeting of CD33+ leukemia cells by a natural killer cell line modified with a chimeric receptor. *Leuk Res* *29*(3), 301–306.
- Schneider, T., Sailer, M., Ansorge, S., Firsching, R., and Reinhold, D. (2006). Increased concentrations of transforming growth factor beta1 and beta2 in the plasma of patients with glioblastoma. *J Neurooncol* *79*(1), 61–65.
- Schols, D., Struyf, S., vanDamme, J., Esté, J., Henson, G., and deClercq, E. (1997). Inhibition of T-tropic HIV Strains by Selective Antagonization of the Chemokine Receptor CXCR4. *J Exp Med* *186*(8), 1383–1388.

- Scholz, M., Cinatl, J., Schädel-Höpfner, M., and Windolf, J. (2007). Neutrophils and the blood-brain barrier dysfunction after trauma. *Med Res Rev* 27(3), 401–416.
- Schulte, A., Liffers, K., Kathagen, A., Riethdorf, S., Zapf, S., Merlo, A., Kolbe, K., Westphal, M., and Lamszus, K. (2013). Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110 δ . *Neuro Oncol* 15(10), 1289–1301.
- Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A., Warrick, J., and Murphy, G. (1998). CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* 69(2), 99–104.
- Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A., White, J., Swanson, P., Old, L., and Schreiber, R. (2001). IFN gamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410(6832), 1107–1111.
- Shevach, E. (2000). Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol* 18, 423–449.
- Shimasaki, N., Fujisaki, H., Cho, D., Masselli, M., Lockey, T., Eldridge, P., Leung, W., and Campana, D. (2012). A clinically adaptable method to enhance the cytotoxicity of natural killer cells against B-cell malignancies. *Cytotherapy* 14(7), 830–840.
- Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28(3), 495–500.
- Smith, P., Krohn, R., Hermanson, G., Mallia, A., Gartner, F., Provenzano, M., Fujimoto, E., Goeke, N., Olson, B., and Klenk, D. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1), 76–85.
- Smyth, M., Kelly, J., Baxter, A., Korner, H., and Sedgwick, J. (1998). An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med* 188(9), 1611–1619.
- Smyth, M., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrot, R., Sedger, L., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon- γ -dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193(6), 661–670.
- Smyth, M., Cretney, E., Kelly, J., Westwood, J., Street, S., Yagita, H., Takeda, K., vanDommelen, S., gli-Esposti, M., and Hayakawa, Y. (2005). Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol Immunol* 42, 501–510.
- Somanchi, S., Somanchi, A., Cooper, L., and Lee, D. (2012). Engineering lymph node homing of ex vivo-expanded human natural killer cells via trogocytosis of the chemokine receptor CCR7. *Blood* 119(22), 5174–5182.
- Soneoka, Y., Cannon, P.M., Ramsdale, E.E., Griffiths, J.C., Romano, G., Kingsman, S.M., and Kingsman, A.J. (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nuc Acids Res* 23(4), 628–633.

- Springer, T. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57, 827–872.
- Stockhausen, M., Broholm, H., Villingshoj, M., Kirchhoff, M., Gerdes, T., Kristoffersen, K., Kosteljanetz, M., Spang-Thomsen, M., and Poulsen, H. (2011). Maintenance of EGFR and EGFRvIII expressions in an in vivo and in vitro model of human glioblastoma multiforme. *Exp Cell Res* 317, 1513–1526.
- Stupp, R., Hegi, M., Mason, W., vandenBent, M., Taphoorn, M., Janzer, R., Ludwin, S., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol* 10(5), 459–466.
- Sun, J., Beilke, J., and Lanier, L. (2010). Immune memory redefined: characterizing the longevity of natural killer cells. *Immunol Rev* 236, 83–94.
- Sutlu, T., and Alici, E. (2009). Natural killer cell-based immunotherapy in cancer: current insights and future prospects. *J Intern Med* 266(2), 154–181.
- Sutlu, T., Nyström, S., Gilljam, M., Stellan, B., Applequist, S., and Alici, E. (2012). Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Human Gene Ther* 23(10), 1090–1100.
- Tallerico, R., Todaro, M., diFranco, S., Maccalli, C., Garofalo, C., Sottile, R., Palmieri, C., Tirinato, L., Pangigadde, P., LaRocca, R., et al. (2013). Human NK cells selective targeting of colon cancer-initiating cells: a role for natural cytotoxicity receptors and MHC class I molecules. *J Immunol* 190(5), 2381–2390.
- Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: A cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261(5121), 600–603.
- Tassev, D., Cheng, M., and Cheung, N. (2012). Retargeting NK92 cells using an HLA-A2-restricted, EBNA3C-specific chimeric antigen receptor. *Cancer Gene Ther* 19(2), 84–100.
- Teng, M., Kershaw, M., Jackson, J., Smyth, M., and Darcy, P. (2006). Adoptive transfer of chimeric FcepsilonRI gene-modified human T cells for cancer immunotherapy. *Human Gene Ther* 17(11), 1134–1143.
- Terme, M., Ullrich, E., Delahaye, N., Chaput, N., and Zitvogel, L. (2008). Natural killer cell directed therapies: moving from unexpected results to successful strategies. *Nat Immunol* 9(5), 486–494.
- Tohma, Y., Gratas, C., Biernat, W., Peraud, A., Fukuda, M., Yonekawa, Y., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1998). PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(7), 684–689.
- Töpfer, K., Kempe, S., Müller, N., Schmitz, M., Bachmann, M., Cartellieri, M., Schackert, G., and Temme, A. (2011). Tumor Evasion from T Cell Surveillance. *J Biomed Biotechnol* 2011, 918471.

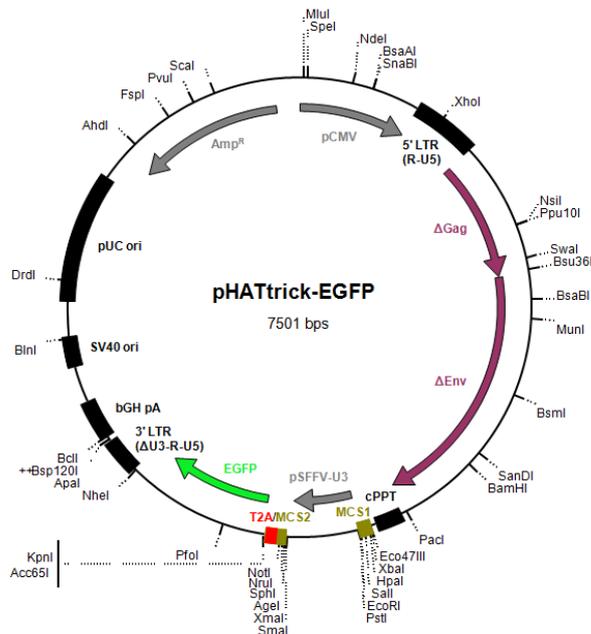
- Tran, A., Zhang, T., Byrn, R., and Roberts, M. (1995). Chimeric zeta receptors direct human NK effector function to permit killing of NK-resistant tumor cells and HIV-infected T-lymphocytes. *J Immunol* *155*(2), 1000–1009.
- Tsuboi, K., Saijom, K., Ishikawa, E., Tsurushima, H., Takano, S., and Morishita, Y. (2003). Effects of local injection of ex vivo expanded autologous tumor-specific T lymphocytes in cases with recurrent malignant gliomas. *Clin Cancer Res* *9*(9), 3294–3302.
- Uherek, C., Tonn, T., Uherek, B., Becker, S., Schnierle, B., Klingemann, H., and Wels, W. (2002). Retargeting of natural killer cell cytolytic activity to ErbB2-expressing cancer cells results in efficient and selective tumor cell destruction. *Blood* *100*(4), 1265–1273.
- Vacchelli, E., Eggermont, A., Fridman, W., Galon, J., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013a). Trial Watch. Immunostimulatory cytokines. *Oncoimmunology* *2*(7), e245850.
- Vacchelli, E., Eggermont, A., Galon, J., Sautès-Fridman, C., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2013b). Trial watch. Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Oncoimmunology* *2*(1), e22789.
- vanderBruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., dePlaen, E., vandenEynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* *254*(5038), 1643–1647.
- vanPel, A., and Boon, T. (1982). Protection against non immunogenic mouse leukemia by an immunogenic variant obtained by mutagenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* *79*(15), 4718–4722.
- Venstrom, J., Zheng, J., Noor, N., Danis, K., Yeh, A., Cheung, I., Dupont, B., O'Reilly, R., Cheung, N., and Hsu, K. (2009). KIR and HLA genotypes are associated with disease progression and survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for high-risk neuroblastoma. *Clin Cancer Res* *15*(23), 7330–7334.
- Vianello, F., Papeta, N., Chen, T., Kraft, P., White, N., Hart, W., Kircher, M., Swart, E., Rhee, S., Palù, G., et al. (2006). Murine B16 Melanomas Expressing High Levels of the Chemokine Stromal-Derived Factor-1/CXCL12 Induce Tumor-Specific T Cell Chemorepulsion and Escape from Immune Control. *J Immunol* *176*, 2902–2914.
- Vila-Coro, A., Rodriguez-Frade, J., MartinDeAna, A., Moreno-Ortiz, M., Martinez, A., and Mellado, M. (1999). The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB J* *13*(13), 1699–1710.
- Ward, S. (2006). T lymphocytes on the move: chemokines, PI3-kinase and beyond. *Trends Immunol* *27*(2), 80–87.
- Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am J Pathol* *174*(4), 1149–1153.

- Wei, J., Barr, J., Kong, L., Wang, Y., Wu, A., and Sharma, A. (2010). Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T-cell proliferation and effector responses by the signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Mol Cancer Ther* 9(1), 67–78.
- Westwood, J., Smyth, M., Teng, M., Moeller, M., Trapani, J., AM Scott, Smyth, F., Cartwright, G., Power, B., Hönemann, D., et al. (2005). Adoptive transfer of T cells modified with humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(52), 19051–19056.
- Wikstrand, C., Reist, C., Archer, G., Zalutsky, M., and Bigner, D. (1998). The class III variant of the epidermal growth factor receptor [EGFRvIII]: characterization and utilization as an immunotherapeutic target. *J Neurovirol* 4(2), 148–158.
- Wong, A., Bigner, S., Bigner, D., Kinzler, K., Hamilton, S., and Vogelstein, B. (1987). Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(19), 6899–6903.
- Wrzesinski, C., Paulos, C., Kaiser, A., Muranski, P., Palmer, D., Gattinoni, L., Yu, Z., Rosenberg, S., and Restifo, N. (2010). Increased intensity lymphodepletion enhances tumor treatment efficacy of adoptively transferred tumor-specific T cells. *J Immunother* 33(1), 1–7.
- Wu, A., Wei, J., Kong, L., Wang, Y., Priebe, W., and Qiao, W. (2010). Glioma cancer stem cells induce immunosuppressive macrophages/microglia. *Neuro Oncol* 12(11), 1113–1125.
- Yang, B., Liu, H., Shi, W., Wang, Z., Sun, S., Zhang, G., Hu, Y., Liu, T., and Jiao, S. (2013). Blocking transforming growth factor- β signaling pathway augments antitumor effect of adoptive NK-92 cell therapy. *Int Immunopharmacol* 17, 198–204.
- Yokoyama, W., Kim, S., and French, A. (2004). The dynamic life of natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 22, 405–429.
- Zhang, M., Kleber, S., Rohrich, M., Timke, C., Han, N., and Tuettenberg, J. (2011). Blockade of TGF- β signaling by the TGF β R-I kinase inhibitor LY2109761 enhances radiation response and prolongs survival in glioblastoma. *Cancer Res* 71(23), 7155–7167.
- Zhang, T., Barber, A., and Sentman, C. (2006). Generation of Antitumor Responses by Genetic Modification of Primary Human T Cells with a Chimeric NKG2D Receptor. *Cancer Res* 66(11), 5927–5933.
- Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zha, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., et al. (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science* 324(5924), 261–265.

6 ANHANG

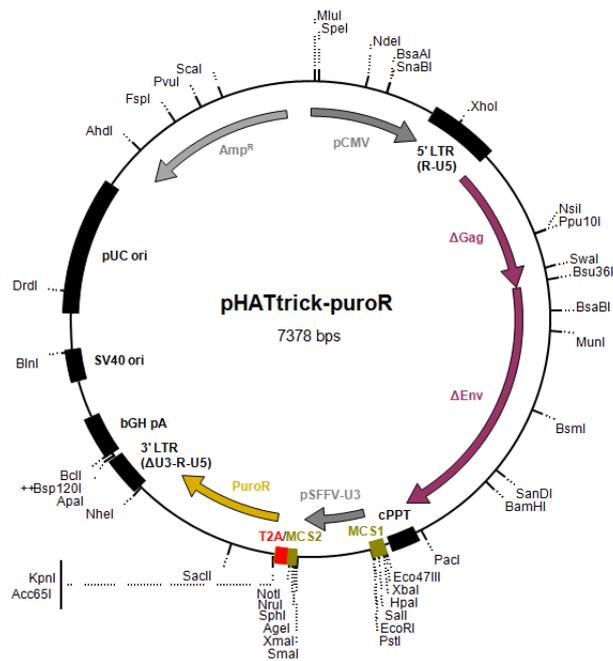
6.1 VEKTORKARTEN

6.1.1 pHATtrick-EGFP

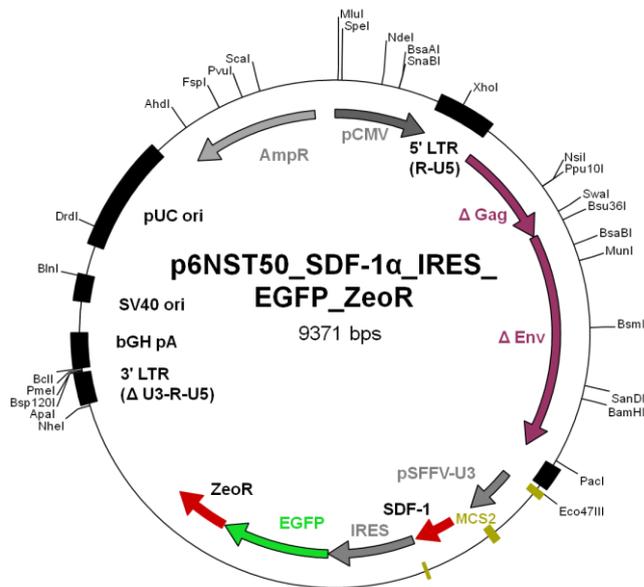


Name	Start	Ende	Beschreibung
pCMV	1	623	Promoter des Constitutive Human Cytomegalovirus (CMV), für Transkription des viralen Genoms
5'-LTR (R-U5)	624	959	Long terminal repeat, für virale Verpackung
ΔGag	960	1663	Verpackungssignal, virale Gruppenantigene
ΔEnv	1664	3127	Verpackungssignal, virales Hüllprotein
cPPT	3155	3295	Zentraler Polypurin-Teil für nukleäre Translokation und Integration des transduzierten viralen Genoms
MCS1	3322	3389	Multiple Klonierungs-Stelle 1
pSFFV-U3	3389	3726	Promoter des Spleen Focus Forming Virus für Transkription von Reporter- und/oder insertierter DNA
MCS2	3757	3868	Multiple Klonierungs-Stelle 2
T2A	3808	3861	selbstspaltendes 2A-Peptid, vermittelt Proteinspaltung in einem einzelnen open reading frame und generiert so mehrere Proteine aus einem einzelnen Promoter
EGFP	3871	4590	enhanced green fluorescence protein als Marker für transfizierte / transduzierte Zellen
3' LTR (ΔU3-R-U5)	4621	4809	für virale reverse Transkription, selbstinaktivierender 3'-long terminal repeat mit Deletion in U3 verhindert die Bildung replikationskompetenter viraler Partikel nach Integration in die genomische DNA
bGH pA	4835	5041	Transkriptionsende und Polyadenylierungssignal
SV40ori	5226	5386	erlaubt die episomale Replikation von Plasmiden in eukaryotischen Zellen
pUC ori	5563	6236	erlaubt „high-copy“-Replikation in <i>E. coli</i>
AmpR	6385	7245	Ampicillin-Resistenzgen für Selektion des Plasmids in <i>E. coli</i>

6.1.2 pHATtrick-puroR



Name	Start	Ende	Beschreibung
pCMV	1	623	Promoter des Constitutive Human Cytomegalovirus (CMV), für Transkription des viralen Genoms
5'-LTR (R-U5)	624	959	Long terminal repeat, für virale Verpackung
ΔGag	960	1663	Verpackungssignal, virale Gruppenantigene
ΔEnv	1664	3127	Verpackungssignal, virales Hüllenprotein
cPPT	3155	3295	zentraler Polypurin-Teil für nukleäre Translokation und Integration des transduzierten viralen Genoms
MCS1	3322	3389	Multiple Klonierungs-Stelle 1
pSFFV-U3	3389	3726	Promoter des Spleen Focus Forming Virus, für Transkription von Reporter- und/oder insertierter DNA
MCS2	3757	3868	Multiple Klonierungs-Stelle 2
T2A	3808	3861	selbstspaltendes 2A-Peptid, vermittelt Proteinspaltung in einem einzelnen open reading frame und generiert so mehrere Proteine aus einem einzelnen Promoter
puroR	3871	4470	Puromycin-Resistenzgen für Selektion transfizierter / transduzierter Zellen
3' LTR (ΔU3-R-U5)	4621	4809	für virale reverse Transkription, selbstinaktivierender 3'-long terminal repeat mit Deletion in U3 verhindert die Bildung replikationskompetenter viraler Partikel nach Integration in die genomische DNA
bGH pA	4835	5041	Transkriptionseende und Polyadenylierungssignal
SV40ori	5226	5386	erlaubt die episomale Replikation von Plasmiden in eukaryotischen Zellen
pUC ori	5563	6236	erlaubt „high-copy“-Replikation in <i>E. coli</i>
AmpR	6385	7245	Ampicillin-Resistenzgen für Selektion des Plasmids in <i>E. coli</i>

6.1.3 p6NST50-SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR

Name	Start	Ende	Beschreibung
pCMV	1	623	Promoter des Constitutive Human Cytomegalovirus (CMV), für Transkription des viralen Genoms
5'-LTR (R-U5)	624	959	Long terminal repeat, für virale Verpackung
ΔGag	960	1663	Verpackungssignal, virale Gruppenantigene
ΔEnv	1664	3127	Verpackungssignal, virales Hüllenprotein
cPPT	3155	3295	zentraler Polypurin-Teil für nukleäre Translokation und Integration des transduzierten viralen Genoms
MCS1	3322	3362	Multiple Klonierungs-Stelle 1
pSFFV-U3	3363	3699	Promoter des Spleen Focus Forming Virus für Transkription von Reporter- und/oder insertierter DNA
MCS2	3674	3720	Multiple Klonierungs-Stelle 2
SDF-1	3856	4127	Vorläufer von SDF-1 (stromal cell-derived factor-1), dem CXC-Chemokin Ligand 12, das über den CXCR4-Rezeptor die Migration von Lymphozyten fördert
MCS2	4128	4145	Multiple Klonierungs-Stelle 2
IRES	4146	4732	internal ribosome entry site, erlaubt die Translationsinitiation inmitten einer mRNA
EGFP-ZeoR	4146	5839	enhanced green fluorescence protein, Marker für transfizierte / transduzierte Zellen fusioniert an Zeocin-Resistenzgen für Selektion transfizierter / transduzierter Zellen
3' LTR (ΔU3-R-U5)	6614	6802	für virale reverse Transkription, selbstinaktivierender 3'-long terminal repeat mit Deletion in U3 verhindert die Bildung replikationskompetenter viraler Partikel nach Integration in die genomische DNA
bGH pA	6828	7034	Transkriptionsende und Polyadenylierungssignal
SV40ori	7219	7379	erlaubt die episomale Replikation von Plasmiden in eukaryotischen Zellen
pUC ori	7556	8229	erlaubt „high-copy“-Replikation in <i>E. coli</i>
AmpR	9238	8378	Ampicillin-Resistenzgen für Selektion des Plasmids in <i>E. coli</i>

6.2 DNA-SEQUENZEN

6.2.1 CXCR4_hygroR

```

      * 10  * 20  * 30  * 40  * 50  * 60  * 70  * 80  * 90
1  ATGGAGGGGATCAGTATATACACTTCAGATAACTACACCGAGGAAATGGGCTCAGGGGACTATGACTCCATGAAGGAACCCCTGTTCCCGTGA
93  AGAAAAATGCTAATTTCAATAAAAATCTTCCTGCCACCACCTACTCCATCATCTTCTTAAGTGGCAITGTGGGCAATGGATTGGICATCCCTGG
185  TCATGGGTTACCAGAAGAACTGAGAAGCATGACGGACAAGTACAGGCTGCACCTGTCAGTGGCCGACCTCCTCTTTGTCATCACGCTTCCC
277  TTCTGGGCAGTTGATGCCGTGGCAAACCTGGTACTTTGGGAACTTCTATGCAAGGCAGTCCATGTCTACACAGTCAACCTCTACAGCAG
369  TGTCTCATCTTGGCCTTTCATCAGTCTGGACCGCTACTTGGCCATCGTCCACGCCACCAACAGTCAAGGCAAGGAAGCTGTTGGCTGAAA
461  AGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGATCCCTGCCCTCCTGCTGACTATTCCCGACTTTCATCTTTGCCAACGTCAGTGAAGGCAGATGACAGATAT
553  AICTGTGACCCGCTTACCCCAATGACTTGTGGGTGGTGTGTTCCAGTTTCAGCACATCAIGGTTGGCCTTATCCTGCCTGGIATTGTGAT
645  CCTGTCTGCTATTGCATTATCATCTCCAAGCTGTCACACTCCAAGGGCCACCAGAAGCGCAAGGCCCTCAAGACCACAGTCATCCTCATCC
737  TGGCTTTCTTCGCTGTTGGCTGCCTTACTACATTGGGATCAGCATCGACTCCTTTCATCCTCCTGGAAATCATCAAGCAAGGGTGTGAGTTT
829  GAGAACACTGTGCACAAGTGGATTTCATCACCAGGCCCCTAGCTTTCTTCCACTGTTGTCTGAACCCCACTCTATGCTTTCCCTGGAGC
921  CAAATTTAAAACCTCTGCCCAGCAGCAGTCACTCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAGGAAAGCGAGGTGGACATT
1013  CATCTGTTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTCACTCCAGCGGAccgcGGCCGCctacaccaggtaggggacagaggaagtcttctaaaca
1105  agcggtagcgtggaggagaaatcccgccctGGTACCGCCACCgatagatccggaaagcctgaactcaccgcgacgtctgtcgagaagtcttct
1197  gatcgaaaagtccgacagcgtctccgacctgatgcagctctcggagggcgaagaatctcgtgctttcagcttcgatgtaggagggcgtggat
1289  atgtcctgcccggtaaatagctgcccgatggtttctacaaagatcgttatgtttatcggcactttgcatcggccgogctcccgatccggaa
1381  gtgcttgacatggggaattcagcgagagcctgacctattgcatctcccgcgtgcacaggggtgacagttgcaagacctgcctgaaaccga
1473  actgcccogctgttctgcagccggtcgcggaggccatggatgcgatcgtgcccgatcttagccagacgagcgggttcggccattcggac
1565  cgcaaggaatcggtaatacactacatggcgtgattcatatgcccgatgtgctatccccatgtgtatcactggcaaacctgtgatggacgac
1657  accgtcagtgcgctccgtcgcgaggctctcgatgagctgatgcttgggcccaggactgccccgaagtccggcacctcgtgacagcgattt
1749  cggctccaacaatgtcctgacggacaatggccgcataacagcggctcattgactggagcagggcagatgttcggggattccaatacagaggtcg
1841  ccaacatcttctctggaggccgtggttggcttgatggagcagcagcgcgctacttcgagcggaggcatccggagcttgacaggatcgcgg
1933  cggctccggcgatataatgctccgcatggcttgaccaactctatcagagcttgggtgacggcaatttcgatgatgcagcttgggcccaggg
2025  tcgatgcgacgcaatcgtccgatccggagccggactgtcgggctacaaaatcgcgccgagaagcggccgctctggaccgatggctgtg
2117  tagaagtactcgcgatagtggaaccgacgccccagcactcgtccgagggcgaaggaataa

```

```

1  MEGISITYSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGNGLVILVMGYQK
71  KLRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISL
141  DRYLAIVHATNSQRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVV
211  VFQFQHIMVGLILPGIVILSCYCIHISKLSHSHKGHQKRKALKTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLE
281  IIKQGCEFENTVHKWISITEALAFFHCLNPILYAFLGAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGKRGG
351  HSSVSTESESSSFHSSGPRPPTPGEGRGSLLTCGDVEENPGPGTATDRSGKPELTATSVEKFLIEKF
421  DSVSDLMQLSEGEESRAFSFDVGGRGYVLRVNSCADGFYKDRYVYRHFASAALPIPEVLDIGEFSES
491  LTYCISRRAQGVTLQDLPETELPAVLQPVAEAMDAIAAADLSQTSFGFPFGPQGIGQYTTWRDFIC
561  AIADPHVYHWQTMDDTVSASVAQALDELMLWAEDCPEVRHLVHADFGSNNVLTDNGRITAVI
631  DWSEAMFGDSQYEVANIFFWRPWLACMEQQTRYFERRHPELAGSPRLRAYMLRIGLDQLYQSLV
701  DGNFDDAAWAQGRCDIVRSGAGTVGRTQIARRSAVWTDGCVEVLADSGNRRPSTRPRAKE*

```

6.2.2 CXCR4_puroR

```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90
1 ATGGAGGGGATCAGTATATACACTTCAGATAACTACACCAGGAAATGGGCTCAGGGGACTATGACTCCATGAAGGAACCTGTTCCGTGA
93 AGAAAATGCTAATTTCAATAAAATCTTCTGCCACCATCTACTCCATCATCTTCTTAAGTGGCATTGTGGGCAATGGATTGGTCATCCTGG
185 TCATGGGTTACCGAAGAAGAACTGAGAAGCATGACGGACAAGTACAGGCTGCACCTGTCAGTGGCCGACCTCTCTTTGTCATCACGCTTCCC
277 TTCTGGGCAGTTGATGCCGTGGCAAACTGGTACTTTGGGAACCTTCCATGCAAGGCAGTCCATGTCATCTACACAGTCAACCTCTACAGCAG
369 TGTCTCATCCTGGCCTTCATCAGTCTGGACCGCTACCTGGCCATCGTCCACGCCACCAACAGTCAAGGCCAAGGAAGCTGTTGGCTGAAA
461 AGGTGGTCTATGTTGGCGTCTGGATCCCTGCCCTCTGCTGACTATTCCCGACTTCATCTTTGCCAACGTCAGTGAGGCAGATGACAGATAT
553 ATCTGTGACCGCTTCTACCCCAATGACTTGTGGGTGGTTGTGTTCCAGTTTCAGCACATCATGGTTGGCCTTATCCTGCCTGGTATTGTCAT
737 CCTGCTCTGCTATTGCATTATCATCTCCAAGCTGTCACACTCCAAGGGCCACCAGAAGCGCAAGGCCCTCAAGACCACAGTCATCCTCATCC
645 TGGCTTTCTTCGCTGTTGGCTGCTTACTACATTGGGATCAGCATCGACTCCTTTCATCCTCTGGAAATCATCAAGCAAGGGTGTGAGTTT
829 GAGAACACTGTGCAAAAGTGGATTTCCATCACCGAGGCCCTAGCTTCTTCCACTGTTGTCTGAACCCCATCCTCTATGCTTTCCCTGGAGC
921 CAAATTTAAAACCTCTGCCAGCACGCACTCACCTCTGTGAGCAGAGGGTCCAGCCTCAAGATCCTCTCCAAGGAAAGCGAGGTGGACATT
1013 CATCTGTTTCCACTGAGTCTGAGTCTTCAAGTTTTCACTCCAGCGGAaccgGCGCGCctacaccaggtgagggcagaggaagtcttctaaca
1105 tggcgtgacgtggaggagagaatccccggccctGGTACcgccatgacagagtacaagccccaggtgcgccctcgccaccgcgacgacgtccccag
1197 ggcgtaacgacacctcgccgcgcggttcgcccactaccocgccaacgcgccaacacgctcgatccggaccgccaacatcgagcgggtcaccgagc
1289 tgcaagaactctcctcagcgcgcgtcgggctcgacatcggaaggtgtgggtcgcggaagcggcgccggtggcggtctggaccacgcgg
1381 gagagcgtcgaagcggggcggtgttcgcccagatcgcccccgcacatggccaggttgagcgggtccccgctggccgcgacagacagatgga
1473 aggcctcctggcgcgcacccgcccaggagcccgcgtggttctggccaccgctcgccgctcgcgccaccaccagggaagggctcgggca
1565 ggcgctcgtgctccccggagtgaggcggcggagcgcgggggtgccccctcctggagacctccgcccccgcaacctccccctctac
1657 gagcggctcggcttaccgctcaccgcgaagtcgaggtgcccgaaggaccgcccacctggctgatgaccgcaagcccggctgctga

```

1 MEGISITYSDNYTEEMGSGDYDSMKEPCFREANANFNKIFLPTIYSIIFLTGIVGNGLVILVMGYQKK
71 LRSMTDKYRLHLSVADLLFVITLPFWAVDAVANWYFGNFLCKAVHVIYTVNLYSSVLILAFISLDR
141 YLAIVHATNSQRPRKLLAEKVYVGVWIPALLLTIPDFIFANVSEADDRYICDRFYPNDLWVVVFQF
211 QHIMVGLILPGIVILSCYCIISKLSHSHKQKRLKLTTVILILAFFACWLPYYIGISIDSFILLEIKQG
281 CEFENTVHKWISITEALAFFHCLNPILYAFGLAKFKTSAQHALTSVSRGSSLKILSKGRGGHSSVS
351 TESESSFHSSGPRPPTPGEGRGSLLTCGDVEENPGPGTAMTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAA
421 FADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVAVWTTPESEVAGAVFAEI
491 GPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPVGEAAERAG
561 VPAFLETSAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA*

6.2.3 Ikg_DAP12_puroR

```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 *
1 atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccaggttccactggtgacgcggcccagccggccaggcgcgc
87 ggcgctcagaaagcttggtagcagctcggatccaggtgaaagctgacggagctctgggggaggatctggaggatctgcatgctgta
173 acgaacaaaactcactctcagaagaggatctggaggatctCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGTAGCCCGGGCGTG
259 CTGGCAGGGATCGTGATGGGAGACCTGGTGTGACAGTGTCTATTGCCCTGGCCGTGTACTTCTGGCCGGCTGGTCCCTCGGGG
345 GCGAGGGGCTGCGGAGGCGACCGGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTTCGCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGG
431 ATGCTACAGCGACCTCAAcacacagagggcgtattacaaaggaggGCGGCCGCctacaccaggtgagggcagaggaagtcttcta
517 acatggcgtgacgtggaggagagaatccccggccctGGTACcgccatgacagagtacaagccccaggtgcgccctcgccaccgcgacga
603 cgtccccagggcgtacgcacacctcgccgcgcggttcgcccactaccocgccaacgcgccaacacgctcgatccggaccgccaacatcg
689 agcgggtcaccgagctgcaagaactctcctcagcgcgcgtcgggctcgacatcggaaggtgtgggtcgcggaagcggcgccgctgg
775 gtggcgtctggaccacgcgagagcgtcgaagcggggcggtgttcgcccagatcgcccccgcacatggccgaggttgagcggctc
861 ccggctggcgcgcagcaacagatggaaggcctcctggcgcgcacccgcccaggagcccgcgtggttctggccaccgctggcg
947 tctcgccgaccaccagggaagggctcggcagcgcgctcgtgctccccggagtgaggcggccgagcgcgggggtgcccgc
1033 ttctggagacctccgcccccgcaacctccccctctacgagcggctcggcttccaccgtaaccgcccagctcagaggtgccgaagg
1119 accgcccacctggtgcatgaccgcaagcccggctgctga

```

1 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAAQPARRARRTKLGTELGSQVKLQESGGGSGGSACVNEQKLISE
71 EDLGGSAQSDCSCSTVSPGVLGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPRGRGAAEAATRKQRITET
141 ESPYQELQGQRSDVYSDLNTQRPYYKGGRPPTPGEGRGSLLTCGDVEENPGPGTAMTEYKPTVRL
211 ATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVVVADDGAAVA
281 VWTTPESEVAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAWFLATVGVSPDHQKGLG
351 LGSVVLPVGEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA*

6.2.4 Igκ_MR1.1_DAP12^{mut}

```

      * 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90
1 atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccagggtccactggtgacgcgCAGGTGAAACTGCAGCAGTCTGGGG
93 AGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCTCCTGTGTAACCTCTGGATTCACTTTAGAAAATTTGGCATGTCTTGGGTTCCGCCAGA
185 CTTCAGACAAGAGGCTGGAATGGGTCGCATCCATTAGTACTGGCGGTTATAATACCTACTATTAGACAATGTAAGGGCCGATTACCATC
277 TCCAGAGAGAATGCCAAGAACCCCTGTACCTGCAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGCACAAGAGGCTATT
369 TCCGTACAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACCGTCCCTCAAGTGGAGGCGGTTGAGGCGGAGGTGGCTCTGGCG
461 GTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCATCCCTGTCCGTGGCTACAGGAGAAAAGCCACTATCAGATGCATGACCAGCATA
553 GATATTGATGATGATATGAACTGGTACCAGCAGAAAGCCAGGGAACTCCTAAGTTCCTTATTTAGAAAGGCAATACTCTTCGTCTGGAGT
645 CCCATCCCGATTTTCCAGCAGTGGCACTGGCACAGATTTTGTTTTACAATTGAAAACACACTCTCGGAAGATGTGGTACTACTACTGT
737 TGCAATCCTGGAACGTGCCTCTTACATTCGGTGATGGCACCAGCTGGAAGGcggaggatctggaggatctgcatgctgtaacgaacaaaaa
829 ctcatctcagaagaggatctcggaggatctCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGGCCGGCGTCTGGCAGGGATCGTGAT
921 GGGAGACCTGGTGTGACAGTGTCAITGGCCCTGGCCGTGACTTCTGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCAGGGGCTCGGAGGCAGCGA
1013 CCCGAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTCCCTTCTCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGTCCGATGTCCTAGCGACCTCAAcacacagagg
1105 ccgtattacaaaggaggGCGGCCGCctacaccaggtgaggccagaggaagtcttctaacatgaggtagcgtggaggagaatccccccctgg
1197 TACGcccatgaccaggtacaagcccacgggtgogcctcgccaccccgacgacgctccccagggccgtaacgcaacctcgccgcccgttcgccc
1289 actaccccgccacgcccacaccgtcgatccggaccgcccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttccctcagcgcgctcgggctc
1381 gacatcggcaaggtgtgggtcgcgggacgacgcccgcggtggcggtctggaccacgcccggagagcgtcgaagcgggggcccgtgttcgcccga
1473 gatcggcccgccatggccgagttgagcgggtcccggtggccgcccagcaacagatggaaggcctcctggcgcgcacccggcccaaggagg
1565 ccgctggttctctggccaccgtcggcgtctcgcccgaaccagggcaagggtctgggcagcgcgctcctcctcccgagtgaggcggcc
1657 gagcgcgcccgggtgcccgccttctggagacctccgcgcccgcacacctccccttctacgagcggctcggcttcaccgtcacgcgacgt
1749 cgaggtgcccgaaggaccgcccacctggtgcatgaccggcaagcccgggtgctga

```

```

1 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAQVKLQQSGGLVKPGASLKLSCVTSGFTFRKFGMSWVRQTS
71 KRLEWVASISTGGYNTYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSLKSSEDALYYCTRGYSPYSYAM
141 DYWGQGTTVTVSSSSGGSGGGSGGGSDIELTQSPASLSVATGEKATIRCMTSTDIDDDMNWYQ
211 QKPGEPKFLISEGNLRLPGVPSRFSSSGTGTDFVFTIENTLSEVDVGDYYCLQSWNVPLTFGDGTL
281 ESGGSGSACVNEQKLISEEDLGGQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPR
351 GRGAAEAATRQKQRTETESPSQELQQRSDVSSDLNTRPYYKGGRPPTPGEGRGSLLTCGDVEEN
421 PPGTAMTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGL
491 DIGKVVVADDGAAVAVWTTPEVVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAW
561F LATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSAAPRNLPFYERLGFVTVADVEVPEGPR
631 TWCMTTRKPGA*

```

6.2.5 Igκ_MR1.1_DAP12

```

      * 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90
1 atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggttccagggttccactgggtgacgcgCAGGTGAAACTGCAGCAGTCTGGGG
93 AGGCTTAGTGAAGCCTGGAGCGTCTCTGAAACTCTCTGTGTAACTCTGGAITCATTTCAGAAAATTTGGCATGCTTTGGGTTCCGCCAGA
185 CTTCAGACAAGAGGCTGGAATGGGTGCGATCCATTAGTACTGGCGTTATAATACCTACTATTTCAGACAATGTAAGGGCCGATTACCATC
277 TCCAGAGAGAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAAAATGAGTAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCTTGTATTACTGCACAAGAGGCTATT
369 TCCGTACAGCTATGCTATGGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCAAGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCG
461 GTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCAGCATCCCTGTCCTGGTACAGGAGAAAAAGCCACTATCAGATGCATGACCAGCACT
553 GATATTGATGATGATATGAAGTGGTACCAGCAGAAGCCAGGGGAACCTCCTAAGTTCCTTATTTTCAGAAGGCAATACTCTTCGCTCGGAGT
645 CCCATCCCGATTTCCAGCAGTGGCAGTGGCAGATTTTGTITTTACAATTGAAAAACACACTCTCGGAAGAIGTTGGTGATTACTACTGTT
737 TGCAATCCTGGAACGTGCCTCTTACATTCCGTGATGGCACCAAGCTGGAAAgcggaggatctggaggatctgcatgcttaacgaacaaaaa
829 ctcatctcagaagaggatctggaggatctCAGGCCAGAGCGATTGCAGTTGCTCTACGGTGAGCCCGGGCGTCTGGCAGGGATCGTGAT
921 GGGAGACCTGGTGTGACAGTGTCTATTGCCCTGGCCGTGACTTCTGGGCCGGCTGGTCCCTCGGGGGCGAGGGGCTGCGGAGGCAGCGA
1013 CCCGAAAACAGCGTATCACTGAGACCGAGTGCCTTATCAGGAGCTCCAGGGTCAGAGGTCGGATGTCTACAGCGACCTCAAcacacagagg
1105 ccgtattacaaaggaggGCGGCCGctacaccaggtgagggcagaggaagtcttctaacatgctgggagcgtggaggagaatccgggacctGG
1197 TACGgcatgaccgagtagaagcccacggtgcgctcgccaccgcgacgctcccaggggccgtacgcaccctcgccgcccgttcgccc
1289 actaccccggccacgcccacacgctcgatccggaccgcccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttctcaccgcccgttcgggctc
1381 gacatcggaaggtgtgggtcgccgacgacggcgccggtggcggtctggaccacgcccggagagcgtcgaagcggggcggttccgccga
1473 gatcggcccgcgcatggccgagttgagcgggttcccggtgcccgcgacagacagatggaagccctcctggcgcgcaaccggcccaaggagc
1565 ccgctggttctcggccaccgtcggcgtctcgcccgaaccaccagggaagggtctgggcagcgcgctcgtgctcccggagtgaggcgcc
1657 gagcgcgcccgggtgcccgccttctggagacctccgcccccaacctccccttctacgagcggctcggcttcaccgtcaccgcccagcgt
1749 cgagggtgcccaaggaccgcccacctggtgcatgaccccgaagcccgggtgcctga

```

```

1 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDAQVKLQQSGGLVKPGASLKLSCVTSGFTRFRKFGMSWVRQTS
71 KRLEWVASISTGGYNTYYSDNVKGRFTISRENAKNTLYLQMSSLKSEDTALYYCTRGYSPYSAM
141 DYWGQGTTVTVSSSGGGSGGGGSGGGSDIELTQSPASLSVATGEKATIRCMTSTDIDDDMNWYQ
211 QKPGEPKFLISEGNTLRPGVPSRFSSSGTGTDFVFTIENTLSEVDVGDYYCLQSWNVPLTFGDGTKL
281 ESGGSGSACVNEQKLISEEDLGGQAQSDCSCSTVSPGVLAGIVMGDLVLTVLIALAVYFLGRLVPR
351 GRGAAEAATRQKQITETESPYQELQGQRSDVYDLNTQRPYYKGRPPTPGEGRGSLLTCGDVEEN
421 PPGTAMTEYKPTVRLATRDDVPRAVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGL
491 DIGKVVVADDGAAVAVWTTPEVVEAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKEPAW
561 FLATVGVSPDHQKGLGSAVVLPGVEAAERAGVPAFLETSA PRNLPFYERLGFVTVADVEVPEGPR
631 TWCMTTRKPGA*

```

6.2.6 SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR

```

*   10   *   20   *   30   *   40   *   50   *   60   *   70   *   80   *   90
1  ATGAACGCCAAGGTCGTGGTCTGGTCTGCTGGTCTGCTGACCGCGCTCTGCCTCAGCGACGGGAAGCCCGTTCAGCCTGAGCTACAGATGCC
93  ATGCCGATTCTTCGAAAGCCATGTTGCCAGAGCCAACGTCAAGCATCTCAAATTCACACTCCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTAGCCC
185 GGCTGAAGAACAACAACAGACAAGTGTGCATTGACCCGAAGCTAAAGTGGATTTCAGGAGTACCTGGAGAAAGCTTTAAACAAGTAAGCTAGA
277 GCGGCCCGGGATCCCCCTCCTCCCTCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGGAATAAGGCCGGTGTGCGTITGTCTATATGTgA
369 TTTTCCACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCTAGGGGTCTTTCCCTCT
461 CGCCAAGGAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCTGGAAGGAGCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAACAACGTCTGTAGCGACCCTTI
553 GCAGGCAGCGGAACCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTGTATAAGATAACCTGCAAAGGGCGGCACAACCCAG
645 TGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTGGAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAAGAGTACC
737 CCATTGTATGGGATCTGATCTGGGCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAACGCTTAGGCCCCCCGAACCAG
829 GGGACGTGGTITTCCTTTGAAAAACACGATGATAAGCTTGCCACAACCATGGCCAGATCTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGT
921 GGTGCCCATCTGGTGCAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGCAAGC
1013 TGACCTGAAGTTCACTGCAACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGC
1105 CGTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTCAAGGACGA
1197 CGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGAC
1289 GCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAAC
1381 TTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTGCGCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCT
1473 GCCCACAACCACTACTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCG
1565 CCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGACCGGATCTGCCAAGTTGACCAGTGCCTGTCGGTTCACCGCGCGGACGTC
1657 GCCGGAGCGGTGAGTCTGGACCGACCGGCTCGGTTCTCCCGGACTTCGTGGAGGACGACTTCGCCGGTGTGGTCCGGGACGAGTGC
1749 CCTGTTTCATCAGCGCGGTCCAGGACCAAGTGGTCCGGACAACACCCTGGCTGGGTGTGGGTGCGCGCCCTGGACGAGCTGTACGCCGAGT
1841 GGTGGGAGTGTGTCACGAACTTCCGGGACGCTCCGGGCGGCCATGACCGAGATCGGCGAGCAGCGTGGGGGCGGGAGTTCGCCCTG
1933 CCGGACCCGGCGCAACTGCGTGCACCTCGTGGCCGAGGAGCAGGACTGA

```

```

1  MNAKVVVVLVLVLTALCLSDGKPVLSYRCPFRFFESHVARANVKHLKILNTPNCALQIVARLKN
71  NNRQVCIDPKLKWIQEYLEKALNK*ARAAADPPLPPPPLTLLAEAAWNKAGVRLSICDFPPYCRL
141 AM*GPGNLALSS*RAFLGVFPLSPKECKVC*MS*RKQFLWKLEDKQRL*RPFAGSGTPHLATGAS
211 AAKSHVYKIHLQRRHNPSATL*VG*LWKESNGSPQAYSTRG*RMPRRYPVWDLIWGLGAHALHV
281 FSRG*KNV*APRTTGTWFSFEKHDDKLATTMARSVSKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGE
351 GEGDATYGKLTCLKFICTTGKLPVPWPTLVTTLTLYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERT
421 IFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHNVYIMADKQKNGIKV
491 NFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLEFVTAAGI
561 TLGMDELYKTGSAKLTSAVPVLTARDVAGAVEFWTDRLGFSRDFVEDDFAGVVRDDVTLFISAVQ
631 DQVVPDNTLAWVWVRGLDELYAEWSEVVSTNFRDASGPAMTEIGEQPWGREFALRDPAGNCVH
701 FVAEEQD*

```

6.2.7 EGFRvIII_puroR

```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90 * 100 * 110 * 120
1 ATGCGACCCCTCCGGGACGGCCGGGGCAGCGCTCTGGCGCTGTGGCTGCGCTCTGCCGGCGAGTCGGGCT TGGAGGAAAAGAAAGGTAATTATGGTGCAGATCA GCTCGTGCC
122 TCCGAGCCTGTGGGGCCGACAGCTATGAGATGGAGGAAGACGGCGTCCGCAAGTGTGAAGAAGTGCAGAGGGCCITGCCGCAAAGTGTGTAACGGAAATAGGTATGGTGAATTTAAAGACTC
243 ACTCTCCATAAATGCTACGAATATTTAAACACTTCAAAAACCTGCACCTCCATCAGTGGCGATCCACATCCTGCGCGTGGCATTAGGGGTGACTCCTTCACACATACTCCTCTCTGGAT
364 CCACAGAACTGGATATTCTGAAAACCGTAAAGGAAATCACAGGGTTTTTGTGATTAGGCTTGGCCTGAAAACAGGACGGACCTCCATGCCITTTGAGAACCTAGAAATCATAACGGGCA
485 GGACCAAGCAACATGGTTCAGTTTTCTTGTGACGTCTGACGCTGAACATAACATCCTTGGGATTAGCTCCTCAAGGAGATAAGTGTGAGATGTGATATTTTCAGGAAACAAAATTT
606 GTGCTATGCAAAATACAATAAATGGAAAAAATGTTTGGGACCTCCGGTCAGAAAACAAAATATAAGCAACAGAGGTGAAAACAGCTGCAAGGCCACAGGCCAGGCTGCCATGCCITG
727 TGCTCCCGGAGGGCTCTGGGGCCGGAGCCGAGGACTGCGTCTTTGCCGGAATGTCAGCCGAGGCAGGGAATGCGTGGACAAGTGCACCTTCTGGAGGGTGAAGCCAGGGAGTTG
848 TGGAGACTCTGAGTGATACAGTGCACCCAGAGTGCCTGCGTCCAGGCCATGAACATCACTGCACAGGACGGGACCCAGACAATGTATCCAGTGTGCCACTACATTGACGGCCCCCA
969 CTCGCTCAGAGCTGCCCGCCAGGAGTCTGGGAGAAAACAACACCTGGTCTGGAAGTACGCAGACCCGGCCATGTGTGCCACTGTGCCATCAAAATGCACCTACCGATGCACTGGG
1090 CCAGGTCTTGAAGGCTGCCAACGAATGGGCTAAGATCCCGTCCATCGCCACTGGGATGGTGGGGCCCTCCTCTGTGCTGGTGGTGGCCCTGGGGATCGGCTCTTCATGCGAAGGC
1211 GCCACATCGTTCCGAAGCCACGCTGCGGAGGCTGCTGCAGGAGAGGGAGCTTGTGGAGCCTTTACACCCAGTGGAGAAGCTCCCAACCAAGCTCTCTTGGAGATCTTGAAGGAACTGA
1332 ATTCAAAAGAGTCAAAGTGTGGGCTCCGGTCCGTTCCGCACGGTGTATAAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTGAGAAGTTAAAATTCGGCTGCTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACA
1453 TCTCCGAAAGCCAAAGGAAATCCTCGATGAAGCCTACGTGATGGCCAGCTGGACAACCCCAAGTGTGCCGCTGTGGGCAITGCCCTCACCTCCACCGTGCAGCTCATCACGCAGC
1574 TCATGCCCTTCCGGCTGCCCTCGACTATGTCCGGAAACACAAGAACAAATATGGCTCCAGTACCTGTCAACTGGTGTGTGCAGATCGCAAAGGCATGAACACTTGGAGGACCGCTG
1695 CTTGGTGCACCCGAGCTGGCAGCCAGGAACCTACTGGTGAAAAACCCGACGATGTCAAGATCACAGATTTTGGGCTGGCCAACTGCTGGGTGCGGAAGAGAAGAATACCATCCAGAA
1816 GGAGCAAAAGTGCCTATCAAGTGGATGGCATTGGAATCAATTTTACACAGAAATCTATCCCAAGAGTGTATGTCTGGAGCTACGGGGTGCACCTTTGGGAGTTGATGACCTTTGGATCA
1937 AGCCATATGACGGAATCCCTGCCAGCGAGATCTCCTCCATCCTGGAGAAAGGAGAAGCCCTCCCTCAGCCACCAATATGACCATCGATGTCTACATGATCATGGTCAAGTCTGGATGA
2058 AGAGCGAGATAGTCCGCCAAAGTTCGGTGAAGTTCATCGAATTTCCAAAATGGCCGAGACCCGAGCGTACCTTGTCAATCAGGGGATGAAAGAAATGCAATTTGCCAAGTCTTACA
2179 GACTCCAATCTTACCGTCCCTGATGGATGAAGAAGCATGGACGACGCTGGTGGATGCCGAGGATACCTCATCCACAGCAGGGCTTCTTCAGCAGCCCTCCACGTACAGGACTCCCC
2663 CCCACTGGCCCGAGAAGGCAGCCACCAATTAGCCTGGACAACCTGACTACAGCAGGACTTCTTTCCCAAGGAAGCCAAAGCCAAATGGCATCTTTAAGGGCTCCACAGCTGAAAATGC
2784 AGAATACCTAAGGGTCGCGCCACAAGCAGTGAATTTATGGAGCA GGAGCAGGACCAGGAGATGCGggcgc ttaacacaggtgagggagaggaagttctctaacatcgggtgaggt
2905 gagggaatccggccctcctcctc Cgcatgacccgagtaacaagcccaaggtgogcctcgcacccggcagcagcgtccccagggcgtacgcacccctcgcgcgcggttcgcgcgacacccc
3026 ccaagcgcacacccgtcgatccggaccgcccacatcgagcgggtcaccgagctgcaagaactcttcctcaccgcgctcgggctcgacatcgcaaggttggggtcgggagcagcggcgcgc
3147 ggtggcggctctggaccacccggagagcgtcgaaagcggggcggtgttcggcagatcggcccgccatggccaggtgagcggctccggctggccgcagcaacagatggaagccctc
3268 ctggcgcgcacccggcccaagggccgcggtggttccctggccaccgctcggctctcgcggcaccaccagggcaagggctcgggagcgcgctcgtgctcccgaggtggagggcggcag
3389 gcccggggtgcccgcctcctggagacctcgcgcccgcacccctcctcaccgagcgtcggcttcaccgtaaccgccaagctgaggtgcccgaagggaccgcccacctggtgcat
3510 gaccgcgaagcccggtgcctga

```

```

1 MRPSGTAGAALLALLAALCPASRA LEEKKGNVYVTDH GSCVRACGADSYEMEEDGVRKCKKCEG
71 PCRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNKNTSISGLHLPLVAFRGSFTHTPPLDPQELDILKTVKE
141 ITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVIISGNKNL
211C YANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGREC
281 VDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMG
351 ENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGPTNGPKIPSIATGMV GALLLLLVALGIGLF
421 MRRRHIVRKRTLRLRLLQERELVEPLTPSGEAPNQALLRILKETEFKKIKVLGSGAFGTVYKGLWIPE
491 GEKVKIPVAIKELREATSPKANKEILDEAYVMASVDNPHVCRLLGICLTSTVQLITQLMPFGCLLDY
561 VREHKDNIGSQYLLNWCVQIAKGMNYLEDRLVHRDLAARNVLVKTQPQHVKITDFGLAKLLGAE
631 EKEYHAEGGKVPIKWMALESILHRIYTHQSDVWSYGVTVWELMTFGSKPYDGIPASEISSILEKGER
701 LPQPPICTIDVYMIMVKCWMIDADSRPKFRELIIEFSKMARDPQRYLVIQGDERMHLPSPTDSNFYR
771 ALMDEEDMDDVVDAD EYLIPQQGFFSPPSTSRTPLLSSLSATSNNSTVACIDRNLQSCPIKEDSFL
841 QRYSSDPTGALTEDSIDDTFLPVPEYINQSVKRPAGSVQNPVYHNQPLNPAPSRDPHYQDPHSTA
911 VGNPEYLNVTQPTCVNSTFDSPAHWAAQKGS HQISLDNPDYQQDFFPKEAKPNGIFKGSTAENAEY
981 LRVAPQSSEFIGAGAGPRRMRPPTPGEGRGSLT CGDVEENPGPGTAMTEYKPTVRLATRDDVPR
1051 AVRTLAAAFADYPATRHTVDPDRHIERVTELQELFLTRVGLDIGKVWVADDGAAVAVWTTPEV
1121 EAGAVFAEIGPRMAELSGSRLAAQQQMEGLLAPHRPKPAWFLATVGVSPDHQGKGLGSAVVL
1191 GVEAAERAGVPAFLETSAPRNLPFYERLGFTVTADVEVPEGPRTWCMTRKPGA*

```

6.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Überblick Tötungsmechanismen von NK-Zellen.....	15
Abbildung 2 Vergleichende Signalwege des EGFR wt und EGFRvIII.....	21
Abbildung 3 Allgemeiner Aufbau eines chimären Antigenrezeptors.....	22
Abbildung 4 Aufbau des CXCR4-Chemokinrezeptors und seine Interaktion mit SDF-1 α	25
Abbildung 5 Darstellung der in dieser Arbeit eingesetzten chimären Antigenrezeptoren (CAR)..	26
Abbildung 6 Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker auf Tumorzelllinien. ...	71
Abbildung 7 Durchflusszytometrische Analyse der MFI von Oberflächenmarkern bei YTS und primären humanen NK-Zellen.....	73
Abbildung 8 Schemata von EGFR wt und EGFRvIII.....	76
Abbildung 9 Schema des SDF-1 α -Expressionsplasmids.....	76
Abbildung 10 Schemata der CXCR4-Chemokinrezeptoren.....	78
Abbildung 11 Schemata der chimären Antigenrezeptorkonstrukte	80
Abbildung 12 PCR zum Nachweis von EGFRvIII-mRNA in den Tumorzelllinien.....	81
Abbildung 13 Immunoblot des aufgereinigten scFv(MR1.1)..	82
Abbildung 14 Oberflächenexpression von EGFRvIII auf eingesetzten Tumorzelllinien.....	83
Abbildung 15 Klonales Überleben verschiedener U87-MG-Zielzellen..	84
Abbildung 16 Durchflusszytometrische Analyse U87-MG ^{EGFRvIII} / SDF-1 α nach 21 Tagen in der Maus.	85
Abbildung 17 Proteinbiochemischer Nachweis chimärer Antigenrezeptoren in YTS.....	87
Abbildung 18 Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und CXCR4 auf YTS....	88
Abbildung 19 Beispiel für Isolation und Aufreinigung von NK-Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von Spender 1.....	89
Abbildung 20 Proteinbiochemischer Nachweis chimärer Antigenrezeptoren in NK-Zellen..	91
Abbildung 21 Oberflächenexpression von chimären Antigenrezeptoren und CXCR4 auf primären humanen NK-Zellen von Spender 1 mit Transduktionsprotokoll nach SUTLU et al.....	93
Abbildung 22 <i>in vitro</i> Migration von YTS im Boyden-Kammer-Assay.....	94
Abbildung 23 <i>in vitro</i> Migration NK-Zellen im Boyden-Kammer-Assay.....	95
Abbildung 24 <i>in vitro</i> Aktivierung der zytotoxischen Signalkaskade in YTS.....	97
Abbildung 25 <i>in vitro</i> Zytotoxizität von CAR-armierte YTS gegenüber HLA-negativen K562... ..	98
Abbildung 26 <i>in vitro</i> Zytotoxizität von CAR-modifizierten YTS gegenüber verschiedenen Tumorzelllinien.	99

Abbildung 27 <i>in vitro</i> Zytotoxizität von CAR-armi-erten und CXCR4 positiven YTS gegen-über verschiedenen Tumorzelllinien.....	100
Abbildung 28 <i>in vitro</i> Degranulation von CAR-armi-erten NK-Zellen nach Kokultivierung mit U87-MG wt bzw. EGFRvIII positiven U87-MG.....	101
Abbildung 29 <i>in vitro</i> INF γ -Sekretion von CAR-armi-erten NK-Zellen nach Kokultivierung mit U87-MG wt bzw. EGFRvIII positiven U87-MG	103
Abbildung 30 <i>in vitro</i> Zytotoxizität von NK-Zellen gegen-über verschiedenen Tumorzelllinien.. ..	104
Abbildung 31 <i>in vivo</i> Migration von YTS-Zellen zu SDF-1 α sekretierenden U87-MG. Fluoreszenzmikroskopische Analyse von 10 μ m-Kryoschnitten.. ..	107
Abbildung 32 <i>in vivo</i> Migration von YTS-Zellen zu SDF-1 α sekretierenden U87-MG. Auszählung der eingewanderten Zellen in den fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der 10 μ m-Kryoschnitte.....	107
Abbildung 33 <i>in vivo</i> Zytotoxizität von YTS-Zellen gegen U87-MG ^{EGFRvIII} bei subkutaner Koinjektion.....	109
Abbildung 34 <i>in vivo</i> Zytotoxizität von YTS-Zellen gegen etablierte Tumore von U87-MG ^{EGFRvIII} bei systemischer Applikation.. ..	110
Abbildung 35 <i>in vivo</i> Zytotoxizität von YTS-Zellen gegen etablierte Tumore von U87-MG ^{EGFRvIII} / SDF-1 α bei systemischer Applikation.....	112
Abbildung 36 Überblick mögliche inhibitorische und aktivierende Interaktionen.....	116

6.4 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1 NK-Zell-Rezeptoren und ihre Liganden.....	14
Tabelle 2 Überblick KIR-HLA-Interaktionen	17
Tabelle 3 Übersicht verwendete Antibiotika.....	29
Tabelle 4 Übersicht verwendete primäre Antikörper	29
Tabelle 5 Übersicht verwendete sekundäre Antikörper	32
Tabelle 6 Übersicht verwendete Bakterienstämme	32
Tabelle 7 Übersicht verwendete Chemikalien und Substanzen für molekularbiologische Arbeiten	32
Tabelle 8 Übersicht verwendete Chemikalien und Substanzen für zellbiologische Arbeiten.....	33
Tabelle 9 Übersicht verwendete Enzyme.....	34
Tabelle 10 Übersicht verwendete DNA- und Proteingrößenstandards	34
Tabelle 11 Übersicht eingesetzte Inhibitoren.....	34
Tabelle 12 Übersicht verwendete Kits.....	35

Tabelle 13 Übersicht verwendete Puffer und Lösungen zur Analyse und Klonierung von DNA.	36
Tabelle 14 Übersicht verwendete Puffer und Lösungen für Herstellung kompetenter Bakterien	36
Tabelle 15 Übersicht verwendete Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Analysen	37
Tabelle 16 Übersicht verwendete Lösungen und Puffer für zellbiologische Arbeiten	38
Tabelle 17 Übersicht verwendete Bakterienkultur-Medien	38
Tabelle 18 Übersicht eingesetzte Medien für die Zellkultur	39
Tabelle 19 Übersicht verwendete Oligonukleotide für Klonierungen und PCR	40
Tabelle 20 Übersicht verwendete Oligonukleotide für Sequenzierungen	41
Tabelle 21 Übersicht verwendete Plasmide	41
Tabelle 22 Übersicht im Rahmen dieser Arbeit generierte Plasmide	42
Tabelle 23 Übersicht verwendete Software	43
Tabelle 24 Übersicht Verbrauchsmittel	43
Tabelle 25 Übersicht verwendete Zellen und Zelllinien	44
Tabelle 26 Standard-Restriktionsansatz	48
Tabelle 27 Standard-Dephosphorylierungsansatz	48
Tabelle 28 Standard-Ligationsansatz	49
Tabelle 29 Standard-Ansatz für Reverse Transkription	51
Tabelle 30 Standard-PCR-Ansatz	52
Tabelle 31 Standard-PCR-Ablauf	53
Tabelle 32 Zusammensetzung von Acrylamid-Gelen für die SDS-Gelelektrophorese	56
Tabelle 33 Übersicht Arbeitsschritte beim immunologischen Nachweis von Proteinen	57
Tabelle 34 Ablauf der Transfektion eukaryotischer Zellen mit Polyethylenimin	60
Tabelle 35 Versuchsaufbau Migration im Boyden-Kammer-Assay	65
Tabelle 36 HLA-Typisierung Tumorzelllinien	74
Tabelle 37 HLA-Typisierung YTS und primäre humane NK-Zellen	74
Tabelle 38 SDF-1 α -Sekretion von mit p6NST50-SDF-1 α _IRES_EGFP_ZeoR transduzierten Gliomzellen	84
Tabelle 39 SDF-1 α -Sekretion von U87-MG ^{EGFR^{vIII}} / SDF-1 α nach 21 Tagen in der Maus	85
Tabelle 40 Vergleich Transduktionseffizienzen von primären humanen NK-Zellen	92

6.5 FORMELVERZEICHNIS

Formel 1 Berechnung der Primer-Schmelztemperatur	52
Formel 2 Berechnung Lebendzellzahl	58
Formel 3 Berechnung Virustiter	62
Formel 4 Berechnung benötigtes Volumen an virushaltigem ZKÜ für eine bestimmte MOI.....	62
Formel 5 Berechnung spezifische Lyse im Chromfreisetzungs-Assay.....	67
Formel 6 Berechnung des subkutanen Tumorareals <i>in vivo</i>	68

6.6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	anti	CSC	cancer stem cell [engl.], Krebsstammzelle
A	Adenin-Nukleotid	Cy3	Indocarbocyanin
ACT	adoptive cell transfer [engl.], adoptiver Transfer	DAP12	DNAX activating protein of 12 kDa
ADCC	antibody dependent cell mediated cytotoxicity [engl.], antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität	DC	dendritische Zelle
Ag	Antigen	ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
Ak	Antikörper	d. h.	das heißt
AL	Arbeitslösung	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
AML	acute myeloische Leukämie	DMSO	Dimethylsulfoxid
AmpR	Ampicillin-Resistenz	DNA	desoxyribonucleic acid [engl.], Desoxyribonukleinsäure
APC	antigenpräsentierende Zelle	dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
APC	Allophycocyanin	E. coli	Escherichia coli
APS	Ammoniumpersulfat	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ATP	Adenosintriphosphat	EGFP	enhanced green fluorescent protein [engl.], grün. fluoreszierendes Protein
BBB	blood brain barrier [engl.], Blut- Hirn-Schranke	EGFR	epidermal growth factor receptor [engl.]
BCA	bicinchoninic acid [engl.], Bicinchinoninsäure	ELISA	enzyme-linked immune- fluorescence assay [engl.]
BME	Basal Minimal Medium	Env	envelope [engl.], Hüllprotein von Viruspartikeln
bp	Basenpaar	et al.	et alii [lat.], und andere
BSA	bovines Serumalbumin	EtOH	Ethanol
C	Cytosin-Nukleotid	evtl.	eventuell
°C	Grad Celsius	FACS	fluorescence activated cell sorter [engl.], Durchflusszytometer
CAR	chimeric antigen receptor [engl.], chimärer Antigenrezeptor	FAK	fokale Adhäsionskinase
CD	cluster of differentiation [engl.]	FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
cDNA	copy-DNA [engl.]	FKS	fötales Kälberserum
CMV	Constitutive Human Cytomegalovirus promoter	for	forward [engl.], vorwärtsgerichtet
cpm	counts per minute [engl.], Einheit der Radioaktivität	FSC	forward scatter [engl.], Vorwärtsstreulicht
CTC	circulating tumor cell [engl.], zirkulierende Tumorzelle	g	Gramm
C-Terminus	Carboxy-Terminus eines Proteins	g	gravity [engl.], relative Zentrifugalbeschleunigung
CTL	zytotoxischer T-Lymphozyt	G	Guanin-Nukleotid

Gag	group specific antigen [engl.], Kapsidprotein von Viruspartikeln	LAK-Zelle	Lymphokin-aktivierte Killerzelle
GBM	Glioblastom	LB	Luria-Bertani Medium
ggf.	gegebenenfalls	LTR	long terminal repeat [engl.]
G ₄ S ₁ -	Glycin-Serin-Aminosäureabfolge	M, mM, μM	molar (mol / l), millimolar (mmol / l), mikromolar (μmol / l)
Linker			
GVHD	Graft-versus-Host Disease [engl.], unerwünschte Immunreaktion von Zellen des Donors gegen Zellen des Empfängers	MBq MCS	Megabequerel multiple cloning site [engl.], Schnittstelle für mehrere Restriktionsendonukleasen
GVT	Graft versus Tumor [engl.], erwünschte Immunreaktion von Zellen des Donors gegen Tumorzellen	MFI mg, μg MHC	mittlere Fluoreszenzintensität Milligramm, Mikrogramm major histocompatibility complex [engl.], Haupthisto- kompatibilitätskomplex
h	Stunde(n)		
HIF	Hypoxieinduzierte Faktor	MIC	MHC class I chain related antigens
HIV	human immunodeficiency virus [engl.], Humanes Immundefizienz-Virus	min ml, μl	Minute(n) Milliliter, Mikroliter
HLA	human leucocyte-derived antigen [engl.], Oberflächenantigene	MOI	multiplicity of infection [engl.], Viruspartikel pro Zelle
HHRP	horse radish-peroxidase [engl.], Meerrettichperoxidase	MOPS	3-[N-Morpholino]- Propansulfonsäure
hygroR	Hygromycin-Resistenz	mRNA	messenger-RNA [engl.]
IDH	Isocitratdehydrogenase	mut	mutiert
Ig	Immunoglobulin	MW	Mittelwert
IL	Interleukin	NEA	nichtessentielle Aminosäure(n)
INF	Interferon	ng	Nanogramm
IPTG	β-Isopropylthiogalactosid	NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
IRES	internal ribosomal entry site [engl.], interne Ribosomen- Eintrittsstelle	nm N- Terminus	Nanometer Amino-Terminus eines Proteins
ITAM	immunoreceptor tyrosine- based activation motif [engl.], Tyrosinabhängiges Aktivierungsmotiv von Immunrezeptoren	OD ORF	Optische Dichte open reading frame [engl.], offener Leserahmen
ITIM	immunoreceptor tyrosine- based inhibition motif [engl.], Tyrosinabhängiges Inhibierungsmotiv von Immunrezeptoren	p PBMC	petit [frz.], kurzer Chromosomenarm peripheral blood mononuclear cell [engl.], mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
IU	international units [engl.], Enzymeinheit	PBS	phosphate buffered saline [engl.], phosphatgepufferte Kochsalzlösung
i.v.	intravenös	PCR	polymerase chain reaction [engl.], Polymerasekettenreaktion
K	Kelvin	PE	Phycoerythrin
kb	Kilobasen	PEI	Polyethylenimin
kDa	Kilodalton	PFA	Paraformaldehyd
KIR	killer cell immune receptor [engl.]	pmol	Picomol
l	Liter		

pH	pondus hydrogenii [lat.], negativ dekadischer Logarithmus der Ionenkonzentration	TAE- Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase	TBS	Tris-buffered saline [engl.], Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Pol	reverse Transkriptase, Protease und Integrase, Enzyme in Viruspartikeln	TCR	T-Zellrezeptor
Polybren	Hexadimethrinbromid	TEMED	Tetramethylethyldiamin
PuroR	Puromycin-Resistenz	TGF	transforming growth factor [engl.]
q	langer Chromosomenarm	TIL	tumorinfiltrierender Lymphozyt
rev	reverse [engl.], rückwärtsgerichtet	TM	Transmembrandomäne
RNA	ribonucleic acid [engl.], Ribonukleinsäure	Tm	Schmelztemperatur
rpm	round per minute [engl.], Umdrehungen pro Minute	TNF	tumor necrosis factor [engl.]
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium	T _{reg}	regulatorische T-Zelle
RT	Raumtemperatur	u. a.	unter anderem
s, sek	Sekunde(n)	ü. N.	über Nacht
s.c.	subkutan	UV	Ultraviolett
scFv	single chain Fragment variable [engl.], Einzelkettenantikörper	uv	unverdünnt
S.D.	standard deviation [engl.], Standardabweichung	V	Volt
SDS	Sodiumdodecylsulfat	VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
SFFV	Spleen Focus Forming Virus	(v / v)	volume / volume [engl.], Volumenanteil / Volumenanteil
SL	Stammlösung	(w / v)	weight / volume [engl.], Gewichtsanteil/Volumenanteil
SSC	side scatter [engl.], Seitwärtsstreulicht	WB	Western Blot
T	Thymidin-Nukleotid	WHO	World Health Organization
TAA	tumorassoziertes Antigen	wt	Wildtyp
		X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D- Galactopyranosid
		z. B.	zum Beispiel
		ZeoR	Zeocin-Resistenz
		ZKÜ	Zellkulturüberstand
		z. T.	zum Teil

6.7 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation „Generierung und Evaluation von modifizierten NK-Zellen mit SDF-1alpha-Chemotaxis und Reaktivität gegen EGFRvIII-positive Gliomzellen“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Zudem versichere ich, dass die Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegen hat. Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie, Sektion „Experimentelle Neurochirurgie und Tumorimmunologie“, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus der TU Dresden unter wissenschaftlicher Betreuung von Prof. Dr. Hanns Achim Temme angefertigt. Die Promotionsordnung wird anerkannt.

Dresden, den 07. April 2014

Nadja Müller

6.9 LISTE DER PUBLIKATIONEN UND KONFERENZBEITRÄGE

Müller N., Michen S., Klink B., Schröck E., Töpfer K., Schackert G., Temme A. (in Vorbereitung): **Subtle genetic alterations define YTS_{DD} as a new YTS-derived NK-cell subtype.**

Müller N., Michen S., Tietze S., Schulte A., Lamszus K., Schackert G., Pastan I., Temme A. (eingereicht): **Engineering NK cells modified with an EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor to overexpress CXCR4 improves immunotherapy of SDF-1-secreting glioblastoma.** J Immunother

Töpfer K., Michen S., Müller N., Temme A. (in Revision): **DAP12-based activating chimeric antigen receptor for Natural Killer cell tumor immunotherapy.** J Immunol

Töpfer K., Kempe S., Müller N., Schmitz M., Bachmann M., Cartellieri M., Schackert G., Temme A. (2011): **Tumor evasion from T cell surveillance.** J Biomed Biotechnol, 918471

Oppel F., Müller N., Schackert G., Hendruschk S., Martin D., Geiger K., Temme A. (2011): **SOX2-RNAi attenuates S-phase entry and induces RhoA-dependent switch to protease-independent amoeboid migration in human glioma cells.** Mol Cancer, 10:137

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Genterapie, Ulm (2014): **Poster "Targeting EGFRvIII-positive glioma cells using a novel natural killer cell chimeric antigen receptor consisting of DAP12 and scFv(MR1.1)"**

Brain Cancer Conference, Berlin (2013): **Poster "Targeting EGFRvIII-positive glioma cells using a novel natural killer cell chimeric antigen receptor consisting of DAP12 and scFv(MR1.1)"**

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Düsseldorf (2013): **Poster „Development of NK cells with chemotaxis for SDF-1alpha secreting gliomas“**

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Leipzig (2012): **Poster „A novel natural killer cell chimeric antigen receptor type consisting of DAP12 and anti-EGFRvIII-scFv mediates selective killing of EGFRvIII-positive tumor cells“**

Chirurgische Forschungstage, Dresden (2011): **Poster "SOX2-RNAi attenuates proliferation, induces loss of stem cell markers and decreases proteolysis-dependent invasion of human glioma cells"**

Mildred Scheel Cancer Conference, Königswinter (2011): **Poster "SOX2-RNAi attenuates proliferation, induces loss of stem cell markers and decreases proteolysis-dependent invasion of human glioma cells"**, erhielt ein Konferenz-Stipendium